

**Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) –
Zkouška akutní toxicity
zpracováno podle ČSN ISO 6341**

Metoda stanovení akutní toxicity chemických látek, průmyslových odpadních vod a povrchových nebo podzemních vod pro *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)

Princip

Zkouška je založena na určení koncentrace látky, která za 24 (48) hodin imobilizuje 50% jedinců *Daphnia magna* vystavených podmínkám testu.

Samičky *Daphnia magna* mladší 24 hodin jsou po dobu 24 (48) hodin vystaveny působení zkoušeného vzorku, který je v koncentračním rozsahu přidán do ředící vody.

Médium (= ředící voda)

- Zásobní roztoky:
 - 8,88g CaCl₂ se rozpustí v 1l destilované vody
 - 4,93 g MgSO₄ se rozpustí v 1l destilované vody
 - 2,59g NaHCO₃ se rozpustí v 1l destilované vody
 - 0,23g KCl se rozpustí v 1l destilované vody
- na 1 l média se dávkuje 25 ml z každého zásobního roztoku, do odměrné baňky 1l se nalije část destilované vody, přidají se zásobní roztoky a doplní se destilovaná voda
- aeraci se roztok nasytí kyslíkem (koncentrace kyslíku by měla být nad 7 mg/l) a zkontroluje se pH (7,8±0,2)

Podmínky testu

- teplota: 20 ± 2 °C
- délka expozice 24hod (48 hod.)
- tma nebo fotoperioda 16h světla/8 h tmy

Příprava vzorku

Zásobní roztok zkoušené látky se připraví ve skleněné nádobě rozpuštěním známého množství látky v určeném objemu ředící, demineralizované nebo destilované vody.

Zásobní roztoky, které jsou těžko rozpustné ve vodě, mohou být přímo v médiu rozpuštěny nebo dispergovány mikrovlnou disperzí nebo mícháním s rozpouštědlem či disperganty s nízkou toxicitou pro *D. magna* (např. DMSO). Jestliže se používá rozpouštědlo, musí být jeho koncentrace v zásobním roztoku taková, aby nejvyšší koncentrace ve zkoušeném roztoku nepřesahovala **0,1 ml/l**. Pokud jsou zásobní roztoky připraveny v demineralizované vodě, přidá se do každého litru ředící vody nejvýše **10 ml** zásobního roztoku.

Postup testu

- příprava média podle návodu, připravené médium se provzdušňuje nejlépe přes noc
- gravidní samice se den před plánovaným testem přenesou do zvláštní nádoby a do 24 hodin se odloví nově narození jedinci. Ti se pak nechají cca 1 hodinu v čerstvém médiu
- každý test musí obsahovat kontrolu neobsahující žádnou zkoušenou látku (pokud se testovaná látka rozpouští v rozpouštědle, zařazuje se i kontrola na rozpouštědlo) a nejméně pět zkoušených koncentrací, v každé koncentraci i kontrole nejméně 20 jedinců
- mladí jedinci *Daphnia magna* se vnesou do zkušebních nádob tak, aby nebylo více než 5 jedinců na 10 ml, zkušební nádoby se umístí do inkubátoru či klimatizované místnosti
- během zkoušky se organismy nekrmí
- na konci zkušební doby 24h (48h) se spočítají mobilní jedinci v každé nádobě. Jedinci, kteří nebudou schopni se rozplavat za 15 s po mírném zamíchání roztoku, se považují za imobilizované, i kdyby dosud pohybovali tykadly
- určí se koncentrační rozmezí způsobující 0% až 100% imobilizaci a zaznamenají se všechny anomálie v chování *D.magna*

Ověření citlivosti:

K ověření citlivosti *Daphnia magna* se pravidelně stanovuje 24h EC₅₀ dichromanu draselného za použití ředící vody. Pokud je hodnota 24h-EC₅₀ dichromanu draselného mimo rozsah 0,6 - 1,7 mg/l, ověří se přesnost provedení zkoušky, způsob chovu atd.

Zkouška se považuje za platnou, pokud jsou splněny následující podmínky:

- mortalita v kontrole na konci zkoušky je $\leq 10\%$
- 24h- EC₅₀ pro dichroman draselný je v rozsahu 0,6-1,7 mg/l

Domácí úkol:

Pro účely cvičení budeme používat standardní toxikant dichroman draselný.

Koncentrace zásobního roztoku je 160 mg/l nebo 320 mg/l, testované koncentrace budou:

3,2 – 1,6 – 0,8 – 0,4 – 0,2 mg/l.

Je potřeba připravit roztoky tak, aby se do celkového objemu 9,8 ml média přidávalo 200 μ l roztoku dichromanu a to u všech koncentrací stejně.

Spočítejte, jaké koncentrace roztoků je třeba připravit a kolik, když budeme test provádět na desce s pěti jamkami o objemu 10 ml pro každou koncentraci.