

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

Test akutní toxicity (3 minutový test) - Nitěnka obecná *Tubifex tubifex*

1. Cíl

Tento test slouží ke stanovení vlivu chemikálií, chemických přípravků a odpadních vod na zástavu pohyblivosti (imobilizaci) červů *Tubifex tubifex*.

Hlavními přednostmi tohoto testu jsou jednoduchost, reprodukovatelnost, finanční nenáročnost a zároveň šetřící laboratorní zvířata.

2. Charakteristika testu

Test je prováděn s červem *Tubifex tubifex* dle metodiky Tichý a kol. (2007). Princip testu spočívá v tom, že je určitý počet jedinců nitěnek vystaven řadě ředění kontaminované vody nebo rozsahu koncentrací zkoušené látky a sleduje se vliv na jejich mortalitu a imobilizaci.

3. Materiál

3.1 Testovací organismy

Tubifex tubifex – v délce 2–4 cm

3.2 Testované chemikálie

Jako standardní látka pro ověření vitality nitěnek a kontrolu správnosti stanovení byl použit roztok dihydrátu chloridu manganatého **MnCl₂·2H₂O** (Merck), jehož hodnoty akutní toxicity byly stanoveny dlouhodobým sledováním. Hodnota EC50 chloridu manganatého je v rozsahu od **0,122** do **0,152 mol/l**.

3.3 Přístroje a pomůcky

- odměrná baňka 100 ml

- odměrná baňka 25 ml
- kádinka 50 ml
- makrotitrační destičky
- Petriho miska o průměru 80 mm
- entomologická pinzeta
- preparační jehla
- nastavitelná automatická pipeta
- špičky
- stopky
- analytické váhy



Obrázek č. 1: Preparační jehla, entomologická pinzeta

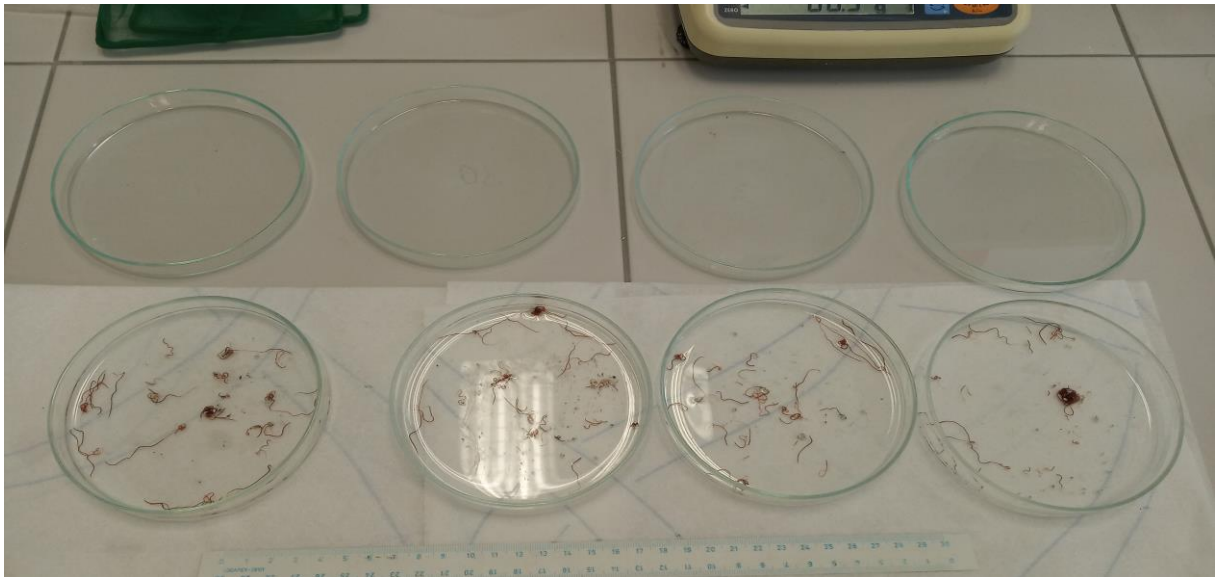
4. Podmínky testu

- Nitěnky o délce těla 2–4 cm
- množství zkoušené směsi či kontroly v jedné jamce makrotitrační destičky: 1 ml
- 6 nitěnek na zkušební jamku
- bez krmení
- teplota: 20–25 °C
- délka expozice: 3 minuty

5. Pracovní postup

5.1 Odchyt nitěnek

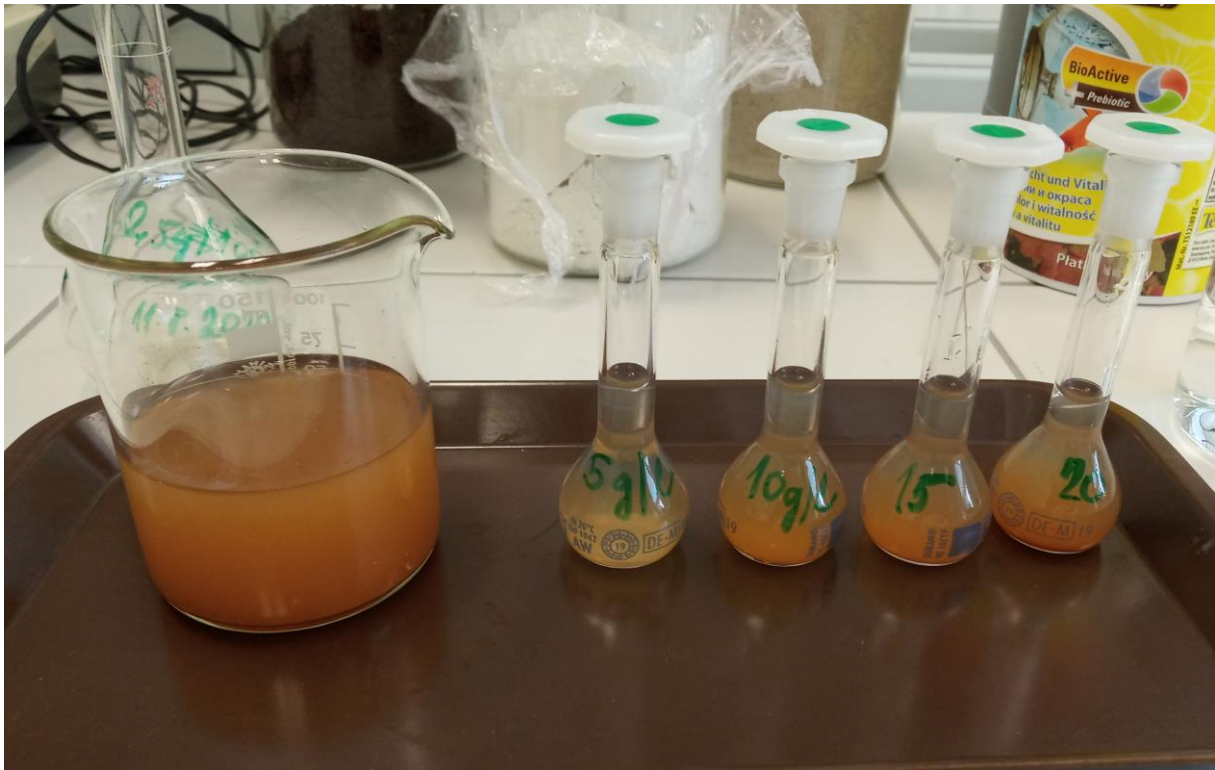
Před samotným testem je potřeba si oddělit z akvarijního chovu část nitěnek a přemístit je pomocí pinzety do Petriho misek s malým množstvím destilované vody. Vybírají se přibližně stejně velké nitěnky o délce těla 2–4 cm.



Obrázek č. 2: nitěnky v Petriho miskách určené k testování

5.2 Příprava referenční látky

- Připravíme koncentrační řadu testované látky (6 koncentrací)
- v kádince s 25 ml destilované vody rozpustíme navážku chloridu manganatého $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (přesně 2,5 g)
- roztok přelijeme do odměrné baňky (100 ml) a doplníme destilovanou vodou po rysku
- takto připravíme **zásobní roztok** o základní **koncentraci 25 g.l^{-1}**
- tento vzorek se dále ředí do 10 ml odměrných baněk, až se připraví koncentrační řada o koncentracích: **20; 17,5; 15; 10; 5 g.l^{-1}**
- **koncentrace 20 g.l^{-1}** : 8 ml zásobního roztoku + 2 ml destilované vody
- **koncentrace $17,5 \text{ g.l}^{-1}$** : 7 ml zásobního roztoku + 3 ml destilované vody
- **koncentrace 15 g.l^{-1}** : 6 ml zásobního roztoku + 4 ml destilované vody
- **koncentrace 10 g.l^{-1}** : 4 ml zásobního roztoku + 6 ml destilované vody
- **koncentrace 5 g.l^{-1}** : 2 ml zásobního roztoku + 8 ml destilované vody



Obrázek č. 3: Připravená koncentrační řada testované látky

5.3 Vlastní testování

- Testování probíhá při teplotě 20–25 °C
- z Petriho misky se rychle, ale opatrně pomocí entomologické pinzety dá osušit na filtrační papír 6 stejně velkých nitěnek, aby nedošlo k naředění roztoku
- do každé jamky se přenese 6 nitěnek
- a napipetuje 1 ml vzorku o nejvyšší koncentraci (25 g.l⁻¹)
- pro každou koncentraci se zvolí 3 opakování
- po uplynutí přesně tří minut se zaznamená počet nehybných jedinců
- stejným způsobem se pokračuje s nižšími koncentracemi (20–5 g.l⁻¹) až do dosažení koncentrace, která nezpůsobuje žádnou zástavu pohybu nitěnek
- tento údaj se použije pro výpočet akutní toxicity, který se vyjádří pomocí EC50
- otestované nitěnky se vyřadí, nedají se použít pro další testování.



Obrázek č. 4: Makrotitrační destička

6. Vyhodnocení testu

- Jako endpoint se hodnotí imobilizace (nitěnky nejeví známky pohybu ani po kontaktu s preparační jehlou) a mortalita
- spočítá se počet nehybných organismů
- výsledky testů se statisticky vyhodnotí, např. pomocí programu TOXICITA.

Výpočet

Z počtu imobilizovaných nitěnek po expozici přesně 3 minuty u každé koncentrace zkoumané látky se stanoví EC50.

Výpočet EC50 se provádí podle následujícího vztahu:

$$\log EC50 = \log Da + d (f + 1)$$

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/nížší) je vždy větší než 1.

Pro názornost zde uvádíme příklad výpočtu EC50 pro referenční látku chlorid manganatý.

Příklad výpočtu:

Koncentrace (g/ml)		Počet nehybných červů po 3 min. expozice	Počet nehybných červů po 3 min. expozice zaokrouhлено
Základní roztok	0,088	6 6 6	6
1. ředění	0,0697	6 6 6	6
2. ředění	0,0552	6 6 6	6
3. ředění	0,0437	6 6 6	6
4. ředění	0,0346	6 6 5	6
5. ředění	0,0274	1 2 1	1
6. ředění	0,0217	0 0 0	0

Hodnotu EC50 vypočítáme pomocí rovnice:

$$\log EC50 = \log Da + d(f + 1)$$

Pro náš případ najdeme v tabulce pro čtveřici údajů o nehybných nitěnkách 0, 1, 6, 6 hodnoty: **Da**= 0,0217; **f** = 0,33333; **R** = 1,26267; **d** = log R = 0,101.

Da nejnižší koncentrace, v našem případě 6. ředění
f tabelovaná konstanta, pro hodnoty 0, 1, 6, 6 najdeme údaj v tabulce
R poměr mezi 5. a 6. ředěním – vyšší koncentrace/nížší koncentrace
d se rovná logaritmu z **R**

Po dosazení dostaneme rovnici a výsledek:

$$\log EC50 = - 1,6635 + 0,101(0,33333 + 1) = -1,5289$$

$$EC50 = 0,0296 \text{ g/ml}$$

Po odlogaritmování můžeme provést zápis EC50 ve tvaru 0,0296 g/ml.

Vysvětlivka:

EC50: účinná koncentrace pro zástavu pohybu červů *Tubifex tubifex*.

7. Použitá literatura

Tichý M., Rucki M., Hanzlíková I., Roth Z. (2007): The Tubifex tubifex Assay for the Determination of Acute Toxicity, *ATLA*, 35, 229–237.

Tichý M., Rucki M., Hanzlíková I., Roth Z. (2008): Acute Toxicity Estimation by Calculation – Tubifex Assay and Quantitative Structure-Activity Relationships, *Environ Toxicol Chem*, 27, 2281–2286

Weil, C. S.: Tables for convenient calculation of medianefective dose (LD50 a ED50) and instruction in their use. (1952) *Biometrics*, 8, 249–263