

Česká zemědělská univerzita v Praze

Katedra vodního hospodářství a environmentálního modelování

**Zavedení metody stanovení chronické toxicity látek
pro *Daphnia magna* Straus**

(Introduction of the method of chronic toxicity determination for *Daphnia magna*
Straus)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Veronika Barnetová

Vedoucí práce: doc. Mgr. Marek Vach, Ph.D.

Praha 2008

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění. Veškeré použité literární prameny a informace, které jsem ve své práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Veronika Barnetová

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se mnou v průběhu diplomové práce spolupracovali a všestranně mi vycházeli vstříc. Především bych chtěla poděkovat doc. Mgr. Marku Vachovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, pomoc a cenné rady. Velký dík patří i Ing. Stanislavu Emingerovi, CSc. za to, že mi prostřednictvím firmy EMPLA spol. s r. o. Hradec Králové umožnil uskutečnění této práce. Zvláštní poděkování patří Mgr. Aleně Ťažké a Kateřině Benediktové, které byly mými odbornými vedoucími po celou dobu práce v laboratoři, a které mi poskytly řadu cenných rad. Velký dík patří i mé rodině za podporu během celé doby studia.

Abstrakt

Úkolem této diplomové práce je zavést metodu stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus do ekologických laboratoří firmy EMPLA spol. s r. o. Přínos nové metody spočívá v tom, že při budoucím testování chemických látek a vodních výluhů odpadů bude možno v laboratoři ověřovat správnost provádění testů. Do laboratoří proto byla zavedena kontrola a test s referenční látkou, kterou byl dichroman draselný. Správnost zavedení kontroly byla potvrzována splněním kritérií dle vyhlášky 222/2004 Sb..

Klíčová slova

Chronická toxicita, *Daphnia magna* Straus, kontrola, dichroman draselný.

Abstract

Purpose of this diploma thesis is to introduce the method of chronic toxicity determination for *Daphnia magna* Straus to ecological laboratories of Empla company, spol. s r.o. Contribution of this new method lies in the possibility to verify the accuracy of executed testing of chemical substances and water leaches wastes directly in the laboratory in the future. Therefore the control and test with reference substance, which was potassium dichromate, was introduced into the laboratories. The accuracy of the control introduction was confirmed by accomplishment of criterias fixed by public notice number 222/2004 Sb.

Keywords

Chronical toxicity, *Daphnia magna* Straus, control, potassium bichromate.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1	DEFINICE POJMU TOXIKOLOGIE A EKOTOXIKOLOGIE	9
2.2	EKOTOXICITA A LEGISLATIVA	9
2.2.1	<i>Ekotoxicita ve vztahu k chemickým látkám</i>	9
2.2.2	<i>Ekotoxicita ve vztahu k odpadům</i>	14
2.2.3	<i>Změny v kritériích platnosti zkoušky</i>	16
2.2.4	<i>Rozpor v OECD TG 211, vyhlášce č. 222/2004 Sb. a ČSN ISO 10706</i>	17
2.3	TESTY TOXICITY	17
2.3.1	<i>Vývoj testů toxicity</i>	17
2.3.2	<i>Definice a rozdělení testů toxicity</i>	18
2.3.3	<i>Princip testů toxicity</i>	20
2.4	ZKUŠEBNÍ ORGANISMUS DAPHNIA MAGNA STRAUS	20
2.4.1	<i>Taxonomické zařazení a význam</i>	21
2.4.2	<i>Popis</i>	21
2.4.3	<i>Rozmnožování</i>	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	PODSTATA ZKOUŠKY	24
3.2	PROSTŘEDÍ ZKOUŠKY	24
3.3	CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY	25
3.3.1	<i>Zkušební organismus</i>	25
3.3.2	<i>Příprava umělé ředící vody</i>	25
3.4	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	26
3.5	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ DICHROMANU DRASELNÉHO	26
3.5.1	<i>Příprava zásobního roztoku</i>	26
3.5.2	<i>Příprava zkoušených roztoků</i>	26
3.6	POSTUP ZKOUŠKY.....	27
3.6.1	<i>Kontroly</i>	27
3.6.2	<i>Obnova zkoušených roztoků</i>	28
3.6.3	<i>Umístění organismů do zkušebních nádob</i>	28
3.6.4	<i>Krmení organismů</i>	28
3.7	POZOROVÁNÍ A MĚŘENÍ.....	30
3.8	PLATNOST ZKOUŠKY	30
4	VÝSLEDKY	32
4.1	ZAVÁDĚNÍ KONTROLY.....	32
4.2	TEST S REFERENČNÍ LÁTKOU Č. 1	35

4.3	TEST S REFERENČNÍ LÁTKOU Č. 2	42
5	DISKUSE	48
5.1	ZAVÁDĚNÍ KONTROLY	48
5.2	TEST Č. 1 S REFERENČNÍ LÁTKOU	48
5.3	TEST Č. 2 S REFERENČNÍ LÁTKOU	48
5.4	VARIAČNÍ KOEFICIENT	49
5.5	PŘÍTOMNOST SAMCŮ	49
5.6	KLADNÉ STRÁNKY METODY	49
5.7	ZÁPORNÉ STRÁNKY METODY	49
6	ZÁVĚR.....	50
7	SEZNAM LITERATURY	51
8	PŘÍLOHY	54

Seznam použitých symbolů a zkratk

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: dihydrát chloridu vápenatého

EC50: koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50% testovacích organismů *Daphnia magna*

21dEC50: koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50% testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku 21 dní

96hEC50: koncentrace testovaného vzorku, která způsobí úhyn nebo imobilizaci 50% testovacích organismů *Daphnia magna* v časovém úseku 96 hodin

KCl: chlorid draselný

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$: dichroman draselný

24hLC50: koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovacích organismů v časovém úseku 24 hodin

48hLC50: koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovacích ryb v časovém úseku 48 hodin

96hLC50: koncentrace testovaného vzorku, která vyvolá úhyn 50% testovaných organismů v časovém úseku 96 hodin

LOEC: nejnižší koncentrace testovaného vzorku, při které jsou pozorovány účinky (lowest observed effect concentration)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: heptahydrát síranu hořečnatého

Na HCO_3 : hydrogenuhličitan sodný

NOEC: nejvyšší koncentrace testovaného vzorku nevyvolávající žádné pozorovatelné účinky (no observed effect concentration)

SO: směrodatná odchylka

VC: variační koeficient

1 ÚVOD

Testy toxicity mají úlohu při hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek a přípravků i při klasifikaci odpadů určených ke skládkování. Jejich hlavní rozdíl oproti analytickým metodám spočívá v synergenci působení látek.

Jedním z hlavních požadavků při testování je snížit počet pokusů na obratlovcích na minimum. Snahou ekotoxikologů je hledat jiné alternativní testy, využívající bezobratlé živočichy, rostliny nebo tkáňové kultury.

V této diplomové práci se budu zabývat zaváděním testu chronické toxicity na *Daphnia magna* Straus do praxe.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Definice pojmu toxikologie a ekotoxikologie

Toxikologie se zpravidla definuje jako nauka o škodlivých a nežádoucích účincích látek (otravách) na živé organismy a ekosystémy, o mechanismech působení škodlivin, o analýze škodlivin ve složkách životního prostředí i biologickém materiálu a interpretace výsledků, o prevenci, diagnostice a léčbě otrav. Hlavním cílem toxikologie je zjišťování nebezpečných vlastností chemických látek a přípravků a stanovení preventivních opatření pro ochranu před jejich účinky. Toxikologie se dělí na užší, specializované oblasti, mezi něž patří i ekotoxikologie. (Heringová, 2005)

Ekotoxikologie je multidisciplinární součást věd o životním prostředí. Propojuje přístupy chemie životního prostředí, toxikologie a ekologie. (Čabala, 2007) Ekotoxikologie (ekologická toxikologie) se zabývá účinky škodlivin na přírodu mimo člověka (na flóru, faunu, ekosystémy) a pohybem látek v biosféře (zejména v potravních řetězcích), možnostmi jejich odstraňování a prevencí škodlivých účinků chemikálií na všechny složky přírody. Bývá spojována s disciplínou ochrana přírody, která však nemá toxikologický charakter. Mezi specializace v této oblasti patří např. hydroekotoxikologie a fytotoxikologie. (Heringová, 2005)

Termín ekotoxikologie použil jako první okolo roku 1969 člen Francouzské akademie věd Dr. Rene Truhaut. Jednalo se o přirozené rozšíření toxikologie. Definoval ekotoxikologii jako „studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společnosti“. (Kočí et Haloušková, 2002)

2.2 Ekotoxicita a legislativa

Ekotoxikologické testy se používají při hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek a přípravků i při klasifikaci odpadů určených na skládky.

2.2.1 Ekotoxicita ve vztahu k chemickým látkám

Zákon č. 356/2003 Sb. „Zákon o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých dalších zákonů“ v platném znění se týká nebezpečných vlastností chemických

látek a chemických přípravků. (Zákon č. 356/2003 Sb.) Zákon vstoupil v platnost 1. 5. 2005 a nahradil tak do té doby platný - zákon 157/1998 Sb. ve znění pozdějších předpisů.

Zákon upravuje práva a povinnosti právnických osob a podnikajících fyzických osob při klasifikaci a zkoušení nebezpečných vlastností, balení a označování, uvádění na trh nebo do oběhu a vymezuje působnost správních orgánů při zajišťování ochrany zdraví a životního prostředí před škodlivými účinky chemických látek a přípravků. Nebezpečné pro životní prostředí jsou látky nebo přípravky, které při vstupu do životního prostředí představují nebo mohou představovat okamžité nebo pozdější nebezpečí pro jednu nebo více složek životního prostředí. (Zákon č. 356/2003 Sb.)

V tomto zákoně je požadavek, aby testování látek bylo prováděno podle zásad správné laboratorní praxe (SLP-GLP Good Laboratory Practice). Zákon stanoví, že osoba, která provádí zkoušení nebezpečných látek, musí použít základní metody při dodržení zásad správné laboratorní praxe. Osoba musí mít osvědčení, které vydá Ministerstvo životního prostředí na základě písemné žádosti. Zároveň jsou zde uvedena i pravidla pro kontroly o dodržování zásad. (Zákon 356/2003 Sb.) Zásady SLP, postupy při ověřování jejich dodržování, postupu při vydávání a odnímání osvědčení a postupu kontroly dodržování SLP při zkoušení vlastností chemických látek a přípravků jsou ve vyhlášce Ministerstva životního prostředí ČR č. 283/200 Sb.

Z tohoto zákona vychází i vyhláška 232/2004 Sb., příloha č. 2 . Vyhláška se zabývá klasifikací látek na základě účinků na životní prostředí.

Základním cílem klasifikace látek a přípravků nebezpečných pro životní prostředí je upozornit uživatele na nebezpečí, která tyto látky a přípravky představují pro ekosystémy. I když se uvedená kritéria vztahují na vodní ekosystémy, je známo, že určité látky a přípravky mohou podobně ovlivňovat jiné ekosystémy. Kritéria pro klasifikaci na základě účinků na životní prostředí vyplývají z testovacích metod. Zkušební metody, požadované pro účely žádosti o registraci, jsou omezené. Pro účely klasifikace a označování se tyto látky a přípravky dělí do dvou skupin na základě akutních nebo dlouhodobých účinků ve vodních systémech, nebo jejich akutních nebo dlouhodobých účinků v ostatních systémech.

Látky se klasifikují jako nebezpečné pro životní prostředí a přiřadí se jim výstražný symbol pro „N“ a R – věty podle následujících kritérií:

R 50 Vysoce toxický pro vodní organismy

a

R 53 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí

Akutní toxicita:

LC50 (96 hod., ryby) $\leq 1 \text{ mg.l-1}$ nebo

EC50 (48 hod., dafnie) $\leq 1 \text{ mg.l-1}$ nebo

IC50 (72 hod., řasy) $\leq 1 \text{ mg.l-1}$,

a

látka není snadno rozložitelná, nebo

$\log \text{Pow} \geq 3,0$ (pokud není experimentálně stanoveno $\text{BCF} \leq 100$);

Poznámka:

$\log \text{Pow}$ = logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol/voda

BCF = biokoncentrační faktor

R 50 Vysoce toxický pro vodní organismy

Akutní toxicita:

LC50 (96 hod., ryby) $\leq 1 \text{ mg.l-1}$ nebo

EC50 (48 hod., dafnie) $\leq 1 \text{ mg.l-1}$ nebo

IC50 (72 hod., řasy) $\leq 1 \text{ mg.l-1}$,

R 51 Toxický pro vodní organismy

a

R 53 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí

Akutní toxicita:

LC50 (96 hod., ryby) $1 \text{ mg.l}^{-1} < \text{LC50} \leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$, nebo

EC50 (48 hod., dafnie) $1 \text{ mg.l}^{-1} < \text{EC50} \leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$, nebo

IC50 (72 hod., řasy) $1 \text{ mg.l}^{-1} < \text{IC50} \leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$,

a

látka není snadno rozložitelná, nebo

$\log \text{Pow} \geq 3,0$ (pokud není experimentálně stanoveno $\text{BCF} \leq 100$).

Látky se klasifikují jako nebezpečné pro životní prostředí a přiřazují se jim R – věty na základě níže uvedených kritérií:

R 52 Škodlivý pro vodní organismy,

a

R 53 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí

Akutní toxicita:

LC50 (96 hod., ryby) $10 \text{ mg.l}^{-1} < \text{LC50} \leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$, nebo

EC50 (48 hod., dafnie) $10 \text{ mg.l}^{-1} < \text{EC50} \leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$, nebo

IC50 (72 hod., řasy) $10 \text{ mg.l}^{-1} < \text{IC50} \leq 100 \text{ mg.l}^{-1}$

a látka není snadno rozložitelná.

Toto kritérium se používá v případech, kdy neexistují dostatečné vědecké důkazy o rozložitelnosti nebo toxicitě, které by prokázaly, že látka ani rozkladné produkty nevytváří potenciální dlouhodobé nebo opožděné nebezpečí pro vodní prostředí. Dodatečný vědecký důkaz je nutno založit na studiích požadovaných pro zkoušení pro účely žádosti o registraci podle §12 zákona, nebo na stejně hodnotných studiích, které by měly zahrnovat:

– ověřenou schopnost rychlé rozložitelnosti ve vodním prostředí

- nepřítomnost účinků chronické toxicity při koncentraci 1 mg.l-1, např.: není-li pozorován žádný účinek při koncentraci vyšší než 1 mg.l-1 při studii dlouhodobé toxicity na rybách a dafniích. (Vyhláška 232/2004 Sb.)

R 52 Škodlivý pro vodní organismy

Látky, které nesplňují výše uvedená kritéria, přesto však mohou, na základě dostupných důkazů týkajících se toxicity, představovat nebezpečí pro strukturu nebo funkci vodních ekosystémů. (Vyhláška 232/2004 Sb.)

R 53 Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí

Látky, které nesplňují výše uvedená kritéria, které však přesto mohou na základě dostupných důkazů týkajících se jejich stálosti, schopnosti kumulace a dále na základě předpovídaného, nebo pozorovaného chování v životním prostředí představovat dlouhodobé nebo opožděné nebezpečí pro strukturu nebo funkci vodních ekosystémů. (Vyhláška 232/2004 Sb.)

Např. na látky špatně rozpustné ve vodě, tj. látky s rozpustností menší než 1 mg.l-1, se vztahují tato kritéria, jestliže:

nejsou snadno rozložitelné, nebo

$\log Pow \geq 3,0$ (pokud není experimentálně stanoveno $BCF \leq 100$).

Tato kritérium se používá pro látku, pokud neexistují další vědecké důkazy o rozložitelnosti nebo toxicitě, které by postačovali k poskytnutí dostatečných záruk, že ani látka, ani produkty jejího rozkladu nepředstavují dlouhodobé nebo opožděné nebezpečí pro vodní prostředí. (Vyhláška 232/2004 Sb.)

Tyto vědecké důkazy je obvykle zapotřebí založit na zkouškách požadovaných podle §12 zákona, nebo zkouškách ekvivalentní hodnoty a mohou zahrnovat:

- prokázaný potenciál rychlého odbourávání ve vodním prostředí,
- nepřítomnost účinků chronické toxicity při mezní rozpustnosti, např. není pozorován vliv koncentrace větší, než je limit rozpustnosti stanovený dlouhodobým testem toxicity na rybách nebo dafniích. (Vyhláška 232/2004 Sb.)

Ve vyhlášce 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí jsou uvedeny metody pro zkoušení vlastností nebezpečných pro životní prostředí.

V červnu roku 2007 vešla Nařízením Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1907/2006 a jeho následnými úpravami a navazujícími předpisy v platnost registrace, evaluace a autorizace chemických látek - REACH. Systém REACH upravuje podmínky platné pro výrobu, dovoz, následnou distribuci a používání chemických látek a jejich směsí ve všech státech EU.

2.2.2 Ekotoxicita ve vztahu k odpadům

Ekotoxicita je ukazatel pro využívání a hodnocení odpadů z hlediska možnosti jejich využívání na povrchu terénu dle vyhlášky č. 294/2005 Sb. a k hodnocení nebezpečné vlastnosti odpadu H14 Ekotoxicita podle vyhlášky 376/2001 Sb. (Věstník MŽP, 2007)

V souladu s platnými právními předpisy (vyhláška MŽP č. 376/2001 Sb., přílohy č. 1 a č. 3) a Metodickým pokynem odboru odpadů MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů (Věstník MŽP, 2007) se v současné době v České republice nebezpečná vlastnost odpadů H-14 Ekotoxicita hodnotí výhradně výsledky testů s vodným výluhem z odpadu.

Zvolený přístup je zastaralý, neodpovídá skutečným potřebám hodnocení nebezpečné vlastnosti H-14 a výsledky získané těmito zkouškami mají velmi omezenou vypovídací schopnost. Ve většině vyspělých států si tento nedostatek uvědomili před 10 a více lety a zavedli pro hodnocení ekotoxicity odpadů nové metodiky, především kontaktní testy, jejichž výsledky mají podstatně vyšší vypovídací schopnost pro pevnou matici než hodnocení podle kvality vodného výluhu. (Matějů et al., 2007)

Hlavní nedostatek metodik stanovení nebezpečné vlastnosti H-14 v českých právních předpisech není ve vybraných bioindikátorech či metodice provádění testů ekotoxicity, ale v tom, že hodnocení ekotoxicity provedené jen na základě testů s vodnými výluhy je překonané a nese s sebou mnoho úskalí. Celkem snadno lze prostou logickou úvahou dojít k tomu, že v tuhém odpadu ve vodě nerozpustný a na pevných částicích nasorbovaný, ale toxický polutant, zvolená sada testů ekotoxicity nemůže postihnout. Mezi polutanty prakticky nerozpustné ve vodě, které se navíc silně sorbují na pevné částice, patří mimo

jiné i polychlorované bifenylly (PCB), vyšší polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované dibenzodioxiny (PCDD), některé chlorované herbicidy a pesticidy a polychlorované dibenzofurany (PCDF), tedy látky, o jejichž nebezpečnosti není pochyb. Je jasné, že ekotoxicita nebezpečných odpadů, které obsahují ve vodě nerozpustné polutanty, stanovená jen ve vodném výluhu dává výsledky značně podhodnocené. (Matějů et al., 2007)

Základním nedostatkem legislativně zavedených testů pro hodnocení nebezpečné vlastnosti H-14 je to, že pokud nebezpečná látka, kterou má test ekotoxicity odhalit a hodnotit, je ve vodě nerozpustná nebo rozpustná jen minimálně, pak ji testy s vodnými výluhy nemohou postihnout nebo jen ve velmi omezené míře. Proto se za normálních okolností běžně volí taková sestava testů ekotoxicity, která zahrnuje i kontaktní testy, které tento nedostatek metod s vodným výluhem řeší. (Matějů et al., 2007) Je zajímavé, že ani metodický pokyn MŽP vydaný až v dubnu 2007, tento závažný nedostatek nedokázal postihnout.

Pro hodnocení vlastnosti H14 ekotoxicita se použijí metody (pro zkoušky akutní toxicity):

- ČSN EN ISO 6341 Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Zkouška akutní toxicity
- ČSN EN 28692 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* (ISO 8692; 1989)
- ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - část 2: Obnovovací metoda
- Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (*Sinapis alba*). Metodický pokyn Ministerstva životního prostředí ke stanovení ekotoxicity odpadů. (Vyhláška 376/2001 Sb.)

Jako nebezpečný se hodnotí odpad, jehož vodný výluh vykazuje ve zkouškách akutní toxicity uvedených v bodě 7 přílohy č. 3 alespoň pro jeden z testovacích organismů při určené době působení testovaného odpadu na testovací organismus:

- a) *Poecilia reticulata* nebo *Brachydanio rerio* (doba působení 96 hod.)
- b) *Daphnia magna* (doba působení 48 hod.)

c) *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) nebo *Scenedesmus subspicatus* (doba působení 72 hod.)

d) semeno *Sinapis alba* (doba působení 72 hod.) tyto hodnoty:

$LC(EC,IC)_{50} \leq 10 \text{ ml.l}^{-1}$ (Vyhláška 376/2001 Sb.)

V oblasti ekotoxikologických biotestů existují agentury, které vydávají a aktualizují normy a metodiky. V USA je to U.S. EPA, a ASTM, v Kanadě je to například Environment Canada, ve Francii AFNOR, v Německu DIN a v České republice ČSN a ČSN – EN – ISO. Aby to nebylo jednoduché, jsou současně platné také tzv. oborové normy pro jednotlivé resorty, či odvětví. Příkladem mohou být oborové normy pro vodní hospodářství, které mají označení TNV. (Maršálek, 2008a, 1.c.)

2.2.3 Změny v kritériích platnosti zkoušky

ČSN ISO 10706 je metodika převzatá z návodu vytvořeného Organizací pro ekonomickou spolupráci a rozvoj OECD TG 211. Ve vyhlášce č. 222/2004 Sb. je uvedeno, že tato zkouška toxicity pro reprodukci je replikou OECD TG 211.

Největší rozdíly, které jsou uvedeny v OECD TG 211, vyhlášce č. 22/2004 Sb. a ČSN ISO 10706 jsou parametry při stanovení platnosti zkoušky. Shodují se v parametru, že střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu živého na konci zkoušky je > 60 . První rozdíl je“

a) celkový počet organismů v kontrolách, vykazující mortalitu dospělých a vývoj v samce, je na konci zkoušky $\leq 20\%$ (ČSN ISO 10706)

a) úmrtnost rodičovského organismu (samiček *Daphnia*) nepřesahuje 20% na konci testu (OECD TG 211, 1998), (Vyhláška 222/2004 Sb.)

Druhý rozdíl je:

b) variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20% (ČSN ISO 10706) Toto kritérium je uvedeno pouze v ČSN ISO 10706. Ve vyhlášce č. 222/2004 Sb. a OECD TG 211 je toto kritérium vypuštěno. Věta: „V dobře vedených zkouškách by měl být variační koeficient středního počtu živých potomků narozených každému matečnému organismu

v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) zpravidla $\leq 25\%$.“ (OECD TG 211, 1998), (Vyhláška 222/2004 Sb.) Věta v tomto znění má pouze doporučující charakter.

Z uvedeného vyplývá, že při převzetí metodiky z OECD TG 211 do ČSN ISO 10706 došlo ke zpřísnění kritérií pro platnost zkoušky.

2.2.4 Rozpor v OECD TG 211, vyhlášce č. 222/2004 Sb. a ČSN ISO 10706

Jak v OECD TG 211, vyhlášce č. 222/2004 tak i v ČSN ISO 10706 je v kapitole Testovací organismy řečeno, že organismy musí pocházet ze zdravé kultury, tj. nesmí vykazovat známky stresu projevující se vysokou mortalitou, přítomností jedinců samčího pohlaví a epifií, přítomností jinak zbarvených jedinců, zpožděním produkce prvních potomků atd. Přesto v kapitolách Analýza dat a vyjadřování výsledků je řečeno, že pokud je jakýkoliv organismus identifikován jako samec, je z analýzy dat vyloučen. Pokud je brána v úvahu možnost, že se v populaci vyskytne samec a tyto data se budou následně analyzovat, není splněna podmínka, která je kladena na začátek testu, tj. že organismus nevykazuje známky stresu, mezi něž patří i výskyt samců. Metodiky tedy nevylučují výskyt samců a počítají se zpracováváním dat z těchto populací, přesto, že z podmínek na začátku testu vyplývá, že tato populace by neměly do testu vstupovat.

2.3 Testy toxicity

2.3.1 Vývoj testů toxicity

Původně byly testy toxicity, jejich metodické postupy, testovací organismy a endpointy vybírány na základě neekologických faktorů, protože ekologické byly obecně nevýznamné. První environmentální problémy, které se objevily, byly akutní a viditelné, zahrnovali např. hynutí organismů vlivem nedostatku kyslíku a vedli k aplikaci převážně rybích druhů při testování vody. Původní problémy byly relativně jednoduché, zahrnovaly polutanty typu organické hmoty, kovů a pesticidů. V průběhu století se však znečištění stalo komplexnějším a nyní zahrnuje směsi chemikálií ve více environmentálních složkách (voda, půda, tkáň, atd.). Efekty znečištění se již netýkají pouze mortality, ale do popředí se dostávají dlouhodobější a obtížněji detekovatelné vlivy jako mutagenita, karcinogenita, vlivy na růst, reprodukci atd. To vede i k mohutnému rozvoji různých metod stanovujících

příčiny a efekty znečištění a ke změně regulačních opatření z nápravy škod způsobených na ekosystému k prevenci a ochraně zdraví ekosystému. (Maršálek, 2008b, 1.c.)

2.3.2 Definice a rozdělení testů toxicity

Biotest lze definovat jako proces, při němž je testovací systém (tkáň, organismus, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku. Ekotoxikologické biotesty můžeme dělit z mnoha hledisek. Dle doby expozice dělíme ekotoxikologické biotesty na akutní, chronické a semiakutní (semichronické). (Maršálek, 2008 a, 2.c.)

Testy akutní toxicity jsou krátkodobé, trvají několik hodin až dní, maximálně však do jednoho týdne. Během testu působí na pokusné organizmy poměrně vysoké dávky toxických látek v průběhu krátkého času. (Heteša et Sukop, 1985)

Testy chronické toxicity trvají dlouhodobě (měsíce až roky). Během testu působí na pokusné organizmy poměrně malé dávky toxických látek v průběhu dlouhého času. Délka pokusu může zahrnovat i délku života několika generací pokusných organismů. (Heteša et Sukop, 1985)

Testy subchronické toxicity trvají několik týdnů a jejich působení zahrnuje maximálně 10 % normální délky života pokusných organismů. Během testu působí na organizmy středně velké dávky toxických látek v průběhu delší doby. (Heteša et Sukop, 1985)

Dále můžeme dělit testy podle testovacího uspořádání na statické, semistatické a průtočné. Dle pokročilosti designu testovacího systému rozeznáváme 3 generace biotestů: 1. generace – standardní, 2. generace – mikrobiotesty, 3. generace – biosenzory, biosondy a biomarkery. Ve světě jsou běžně používány biotesty první generace. Typicky se pro testování ekotoxicity používají ryby, bezobratlí a řasy, přičemž jednotlivé standardní metody se od sebe více či méně odlišují dle legislativy příslušné mezinárodní organizace. Dle trofické úrovně testovacích organismů na producenty, konzumenty a destruenty. Dle testovací matrice na vodu, půdu, vzduch, sediment odpad a chemickou látku. Dle spektra testovacích organismů se rozdělují biotesty na jednodruhové (Single Species) a vícedruhové (Multi Species s přírodními populacemi i laboratorní směsí kultur). Podle typu testovaného vzorku se dělí na čisté chemické látky, směsné látky a přírodní vzorky. Na základě způsobu přípravy vzorku se dělí na definované koncentrace chemických látek,

testování výluhu přírodních vzorků (extrakce organickými rozpouštědly, DMSO, vodou, různé pH, teplota atd.), semipermeabilní membrány, přímé testy a TIE (C18, AC, pH...). Dle stupně komplexnosti detekčního systému na enzymy, biosondy, buněčné a tkáňové kultury in vitro, intakční živý organismus, populace, mikro/mezo kosmos a terénní experimenty. Dále se mohou biotesty dělit dle způsobu vyhodnocování na letální efekty (mortalita, imobilizace), subletální efekty (chování organismů – např. rychlost a směr pohybu), hodnocení fyziologické aktivity, reprodukční aktivita, malformace, teratogenita atd. V rámci speciálních biotestů pro hodnocení rizik v životním prostředí se provádějí testy dle trofie, mutagenity/genotoxicity (nejen na bakteriích, ale také na rostlinách, volně žijících zvířatech a rybách), teratogenity, embryotoxicity a reprodukčních testech na rybách, koryšících, obojživelnících, ptácích, hraboších apod. a dle detekce speciálních mechanismů. (Maršálek, 2008 a, 3.c.)

Testy první generace mají jednu velkou výhodu a to, že jejich metodika je zakotvena legislativně, a proto jsou alespoň na národní úrovni prováděny relativně jednotným způsobem. Na druhé straně jejich provedení je značně ekonomicky náročné. Kultury testovacích organismů je nutno dlouhodobě udržovat, navíc živočichové musí být krmeni dalšími organismy. Samotné testování zabírá mnoho laboratorního prostoru, spotřebovává velké množství testovaného materiálu a v neposlední řadě vyžaduje velký počet laboratorních sil nebo delší pracovní dobu nejen pro provedení testu, ale i na mytí laboratorního skla a péči o matečné kultury. Proto se následující druhá generace biotestů jeví jako výhodná alternativa ke konvenčním testům toxicity. (Maršálek, 2008b, 2.c.)

Mezi biotesty 2. generace tzv. mikrobiotesty patří ty které: využívají klidová stádia testovacích organismů – nevyžadují udržování a kultivaci matečných kultur (MetPad, SOS chromotest, Chromotoxkit, Sediment Chromotest, Mikrotox, Thamnotoxkit, Rotokit, Daphtoxkit, Ceriotoxkit, Porotxkit, Algatoxkit...), nahrazují používání zvířat pro testy toxicity (in vitro tkáňě ryb, bakterie Thamno – Roto – Chromo....), šetří laboratorní a kultivační prostor, vyžadují jen malé objemy vzorků a lze najednou zpracovat stovky vzorků. (Maršálek, 2008a, 4.c)

Třetí generace ekotoxikologických testů – biosenzory je v současnosti na úrovni základního výzkumu a jejich uplatnění se očekává zejména v on-line monitorovacích systémech a screeningových testech toxicity. (Maršálek, 2008b, 3.c.)

Ze srovnávání citlivosti standardních organismů používaných pro ekologické biotesty vyplývá, že citlivost k toxikantům je druhově závislá. Proto je nutná baterie testů složená z různých organismů. Schopnost sestavit takovou baterii ekotoxikologických biotestů, která bude mít co nejreálnější vypovídající hodnotu a jejíž interpretace bude přesně odpovídat na problematiku studované lokality patří k důležitým znalostem každého ekotoxikologa. K tomu je samozřejmě důležité mít přehled o možnostech nejen v normovaných testech, ale také jejich alternativ a nových publikací oboru. (Maršálek, 2008a, 5.c.)

2.3.3 Princip testů toxicity

Testovací organismy se vystavují po zvolené době různým koncentracím testované látky rozpuštěné v ředící vodě, současně se testovací organismy nasadí do ředící vody bez testované látky – kontrola. V určitých intervalech se kontroluje stav testovacích organismů, zaznamenává počet uhynulých jedinců v jednotlivých koncentracích a kontrole. Ze získaných hodnot se probitovou analýzou vypočítá střední letální koncentrace LC50 v časových úsecích u ryb 24, 48, 72 a 96 hod. (24hLC50, 48hLC50, 72hLC50, 96hLC50) a u perlooček 24 a 48 hod. (24EC50 a 48hEC50). Mortalita, případně imobilizace, se v jednotlivých koncentracích vyjádří jako procentický podíl z celkového množství jedinců a převede se na probitové hodnoty. Probitové hodnoty se vynesou do grafu proti logaritmům koncentrací testované látky. Vynesenými body se proloží metodou nejmenších čtverců přímka. Z grafu se poté odečte logaritmus koncentrace LC50 (log LC50) odpovídající probitové hodnotě 5. Po odlogaritmování získáme hledané hodnoty středních letálních (u žábřonožek a perlooček efektivních) koncentrací. Pokud uhynie v testu méně než 50 % testovacích organismů, tak se výpočet LC50 neprovádí. (Kroupová, 2004)

2.4 Zkušební organismus *Daphnia magna* Straus

Ke zkoušce se použije druh *Daphnia magna* Straus. Jiné druhy dafnií mohou být použity, pokud splňují případná kritéria validity (kritérium validity týkající se reprodukční schopnosti kontrolních skupin by mělo být relevantní pro daný druh dafnií). Použijí-li se jiné druhy dafnií, musí být jasně identifikovány a jejich použití musí být zdůvodněno. (Vyhláška 222/2004 Sb.)

2.4.1 Taxonomické zařazení a význam

Říše:	živočichové (Animalia)
Kmen:	členovci (Arthropoda)
Podkmen:	koryši (Crustacea)
Třída:	lupenonožci (Branchiopoda)
Podtřída:	Phyllopoda
Nadřád:	Diplostraca
Řád:	perloočky (Cladocera)

Většina našich perlooček jsou filtrátoři, kteří se živí bakteriemi, fytoplanktonem a detritem, případně seškrabují nárosty řas z povrchu makrofyt (Sukop, 1998)

Perloočky patří k základní potravě ryb, ale živí se jimi i celá řada dalších vodních živočichů. Pro ryby jsou perloočky cennou potravou, protože obsahují velké množství kaloricky hodnotných a lehce stravitelných látek. (Sukop, 1998)

2.4.2 Popis

Jsou to drobní členovci o rozměrech 1-5 mm. Perloočky žijí ve sladkých vodách, některé i v mořích a často se vyskytují ve velkých množstvích. (ČSN EN ISO 6341, 1997)

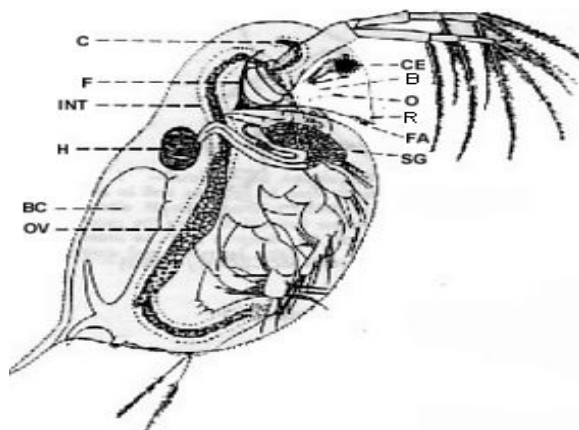
Perloočky mají nezřetelně článkované tělo uložené ve dvouchlopňové skořápce, která může být u dravých druhů redukována. Perloočky mají ze stran zploštělé tělo. Skořápka nikdy nekryje hlavu. Mají jedno velké složené oko a zpravidla i naupliové očko. První pár antén je zakrnělý a má smyslovou funkci. Druhý pár je mohutný, dvouvětevný a slouží perloočkám k pohybu. Mají čtyři až šest párů končetin, které jsou zpravidla listovité a slouží k filtraci potravních částic a k dýchání. U dravých druhů jsou však delší, válcovité a slouží k přidržování kořisti. Konec zadečku je pozmeněn ve zvláštní orgán (postabdomen) zakončený dvěma drápkami. (Hartman et al., 1998)

Celý živočich je průsvitný. Dýchání probíhá celým povrchem těla a výměna plynů probíhá difúzí. (Heringová, 2005)

Obr. 1: Fotografie samičky *Daphnia magna*. (Benediktová, 2008)



Obr. 2: Anatomie samičky *Daphnia magna*. (Kozumplíková, 2006)



(B – mozek, BC – komora s krví, C – trávicí trubice, CE – složené oko, F – podélná lišta skořápky, FA – první tykadlo, H – srdce, INT – střevo, O - očko, OV – vaječníky, R – sosák, SG – žláza).

2.4.3 Rozmnožování

Většina perlooček se rozmnožuje partenogeneticky i sexuálně. Partenogenetické rozmnožování je převažující, dokud nedojde ke změně podmínek prostředí (teplota, množství a kvalita potravy, zkrácení délky dne). To znamená, že po většinu roku je populace perlooček tvořena hlavně partenogenetickými samičkami. Jsou živorodé, ve snůšce mají několik diploidních vajíček, ze kterých se vyvinou samičí jedinci shodní s rodičem. Pro druh *Daphnia magna* je doba embryonálního vývoje při teplotě 25°C asi 46 hodin. Nově narozená mláďata se podobají dospělým. Při sexuálním rozmnožování nejprve dojde ve vaječniku samiček k diferenciaci vajíček a z části se vylíhnou samečkové. Samečkové jsou proti samičkám menší, mají modifikované antenuly a na prvním páru hrudních končetin mají vyvinutý hákovitý trn a dlouhou brvu, pomocí kterých se přichytí samičky při kopulaci. Liší se od samiček i chováním a způsobem plavání. (Heringová, 2005)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Podstata zkoušky

Samičky *Daphnia magna*, mladší 24 hodin, jsou po dobu 21 dní v obnovovací zkoušce vystaveny působení zkoušené látky, průmyslové nebo komunální odpadní vody, povrchové nebo podzemní vody, které jsou v koncentračním rozsahu přidány do ředící vody. Zaznamená se přežívání mateřských organismů a počty živých potomků vyprodukovaných každým živým organismem na konci zkoušky.

Přežívání a reprodukční výtěžek zkušebních mateřských organismů na konci zkoušky (vyjádřený jako počet kusů) se porovná s mateřskými organismy v kontrole. (ČSN ISO 10706, 2001)

3.2 Prostředí zkoušky

Prostředí ve kterém se provádí zkoušky, musí být prosté výparů nebo prachu, jež mohou být toxické pro *Daphnia magna* Straus. (ČSN ISO 10706, 2001)

Zkoušené roztoky se neprovzdušňují. (ČSN ISO 10706, 2001)

Koncentrace rozpuštěného kyslíku ve zkoušených roztocích musí být vyšší než 3 mg/l a hodnota pH musí být v rozsahu 6 až 9 a v průběhu zkoušky se nesmí změnit o více než 1,5 jednotky pH. Suma vápníku a hořčíku musí být vyšší než 140 mg/l (jako CaCO₃), což se prokázalo jako nezbytné pro podporu reprodukce splňující kritéria platnosti. (ČSN ISO 10706, 2001)

Fotoperioda při zkoušce musí být 16 h světla a 8 h tmy. Intenzita světla musí být v rozsahu 600 lux až 800 lux, nesmí přesáhnout 1 200 lux. (ČSN ISO 10706, 2001)

Teplota při zkoušce se udržuje v rozsahu 18°C až 22°C a v průběhu zkoušky nesmí kolísat o více než 2°C (například od 18°C do 20°C, od 19°C do 21°C, nebo od 20°C do 22°C). (ČSN ISO 10706, 2001)

3.3 Chemikálie a materiály

3.3.1 Zkušební organismus

Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea), dále *D. magna*, získaná za určitých podmínek kultivace nejméně o tři generace acyklickou parthenogenesí. (ČSN ISO 10 706, 2001)

Protože citlivost *D. magna* k toxickým látkám může být ovlivněna původem kultury, uvádí se v protokolu o zkoušce stáří a zdroj *D. magna*. (ČSN ISO 10 706, 2001)

Organismus používaný ke zkoušce musí být mladší 24 h, z druhé až páté generace *D. magna* musí pocházet ze zdravé zásobní kultury, nevykazující žádné znaky negativního ovlivnění (stresu), jako je mortality > 20%, výskyt samců, trvalých vajíček (efippií) nebo bezbarvých organismů. Produkce první generace nesmí být opožděna. (ČSN ISO 10706, 2001)

3.3.2 Příprava umělé ředící vody

Pro přípravu ředící vody (dle ČSN ISO 10706 příloha B – rekonstituovaná silně mineralizovaná sladká voda) se naváží:

192 mg NaHCO₃,

120 mg CaSO₄.2H₂O (popř. 103 mg CaCl₂.2H₂O),

120 mg MgSO₄ (popř. 246 mg MgSO₄.7H₂O),

8 mg KCl.

Navážená množství se převedou do odměrné baňky o objemu 1000 ml, kde se rozpustí v deionizované vodě a poté se odměrná baňka doplní deionizovanou vodou po rysku.

Ředící voda se provzdušňuje, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku nedosáhne 95% nasycení a nedojde k ustálení hodnoty pH. Je-li to nutné, upraví se hodnota pH na 8,0 ± 0,5 přidáním roztoku hydroxidu sodného, nebo roztoku kyseliny chlorovodíkové.

3.4 Přístroje a pomůcky

1. Analytické váhy (Sartorius)
2. Laboratorní měřicí přístroj pro měření pH a rozpuštěného kyslíku (Inolab Multi 720)
3. Luxmetr
4. Teploměr (kontrola prostředí)
5. Běžné laboratorní sklo

3.5 Příprava roztoků dichromanu draselného

3.5.1 Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok $K_2Cr_2O_7$ se připraví ve skleněné nádobě. Navážka 1g $K_2Cr_2O_7$ se převede do odměrné baňky o objemu 1000 ml, kde se rozpustí v deionizované vodě a po té se odměrná baňka doplní deionizovanou vodou po rysku. Zásobní roztok je uchováván po dobu zkoušky při 4°C.

3.5.2 Příprava zkoušených roztoků

Zkoušené roztoky se připraví odpipetováním určených objemů (viz.t.č.1) ze zásobního roztoku dichromanu draselného do 500 ml ředící vody. Vznikne tak pět zkoušených koncentrací v geometrické řadě.

Koncentrace byly voleny na základě testů akutní toxicity.

Tabulka č. 1: Test akutní toxicity

Konc.	ÚHYN/ IMOBILIZACE			
	24 h		48 h	
mg/l	ks	%	ks	%
1,25	8	80	10	100
	7	70	10	100
1	3	30	10	100
	5	50	10	100
0,75	1	10	10	100
	0	0	10	100
0,5	1	10	7	70
	0	0	9	90
0,25	0	0	2	20
	0	0	3	30
0,1	0	0	1	10
	0	0	0	0
K1	0	0	0	0
K2	0	0	0	0

Tabulka č. 2: Množství roztoku $K_2Cr_2O_7$ vzhledem k potřebné koncentraci

Koncentrace [mg/l]	0,01	0,05	0,1	0,2	0,3
objem zásobního roztoku [ml]	0,5	2,5	5	10	15

3.6 Postup zkoušky

3.6.1 Kontroly

Každá zkouška musí zahrnovat kontrolu, neobsahující žádnou zkoušenou látku. (ČSN ISO 10706, 2001)

Pokud se používají rozpouštědla nebo dispergant, vyžadují se dvě kontroly. Jedna kontrola neobsahuje žádné rozpouštědlo ani dispergant. Druhá kontrola obsahuje rozpouštědlo nebo dispergant v nejvyšší koncentraci, v níž se vyskytuje v kterémkoliv zkoušeném roztoku. (ČSN ISO 10706, 2001)

3.6.2 Obnova zkoušených roztoků

Norma stanoví, že roztoky by se měly obnovovat nejméně třikrát týdně. V našich testech docházelo k obnově nejčastěji v pondělí, středu a ve pátek.

V průběhu každého ze tří týdnů bylo u nejvyšší koncentrace (0,3 mg/l) $K_2Cr_2O_7$ stanoveno množství CrVI. Stanovení se provádělo v čerstvě připravených roztocích a před jejich obnovou. Zjistilo se, že $K_2Cr_2O_7$ je stálá chemická látka, u které se předpokládá, že její koncentrace zůstává v rozsahu $\pm 20\%$ nominální koncentrace.

3.6.3 Umístění organismů do zkušebních nádob

Mladé organismy (mladší 24 h) ze zásobní kultury na počátku zkoušky byly umístěny do zkušebních nádob. Každý jedinec byl umístěn do zvláštní nádoby obsahující 50ml zkoušeného roztoku.

Obnovovací zkoušky vyžadují nejméně deset organismů vystavených individuálně každé zkoušené koncentraci a kontrole. Dále musí být v čase obnovy roztoků připravena druhá řada zkušebních nádob, do nichž se mateřské organismy přenesou skleněnou pipetou vhodného vnitřního průměru. (ČSN ISO 10706, 2001)

Celková doba expozice zkušebních organismů byla 21 dní.

3.6.4 Krmení organismů

Ke krmení mateřských organismů se používají živé buňky druhu řas *Scenedesmus subcapitatus*. Norma uvádí, že vhodnější je krmit organismy denně, nejméně však při výměně roztoku. V našem testu probíhalo krmení vždy při výměně roztoku.

Řasa je odlita z chovné 4 l lahve do tří 25 ml zkumavek, poté je odstředěna (5min). Odstředěný roztok je dekantován a řasová suspenze je zředěna a promíchána s 5 ml deionizované vody. Obsah všech baněk s naředěnou řasou *Scenedesmus subcapitatus* se slije do jedné baňky a znovu důkladně promíchá.

Aby bylo možno krmit organismy odpovídajícím množstvím uhlíku (0,1 mg až 0,2 mg uhlíku na organismus za den), je nutné spočítat množství řasových buněk v dané baňce. Počítání se provádí v Bürkerově komůrce ve 12 čtvercích. Výsledné množství se násobí faktorem 4,17. Poté se dle rovnice korelační přímky, která ukazuje závislost hustoty buněk řas na množství uhlíku [mg/l] stanoví požadovaná potřebná hustota řasové kultury (viz. Graf č.1). Pomocí vzorce se vypočte objem řasové kultury, kterým by měli být organismy krmeny.

Objem řasové kultury x použité jako krmivo se vypočítá dle níže uvedeného vztahu:

$$x = \frac{V \cdot c}{a}$$

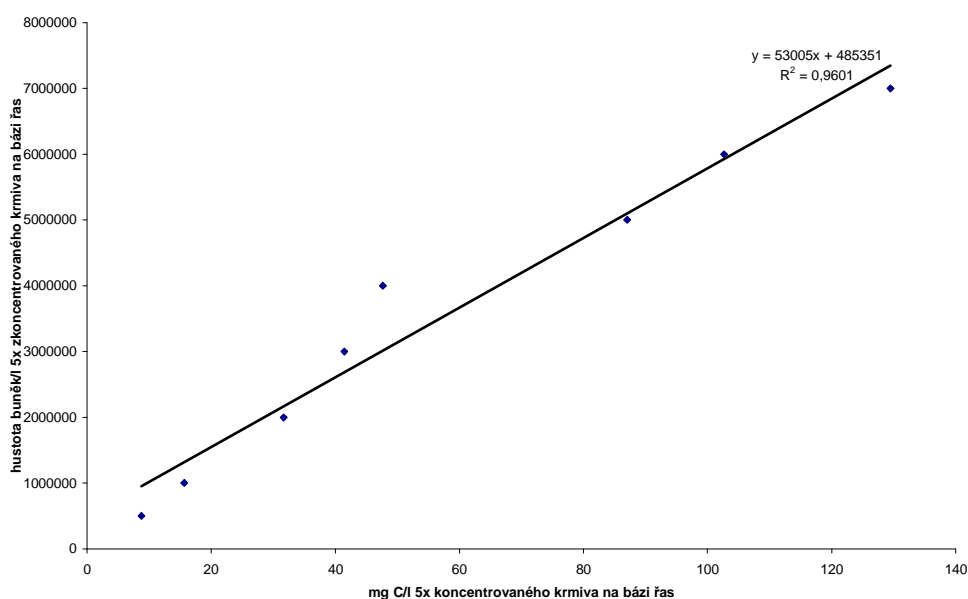
x je objem řasové kultury v ml

c je požadovaná potřebná hustota řasové kultury vypočtená z rovnice korelační přímky

V je množství testovaného roztoku v ml

a je hustota inokulační kultury (zjištěný počet buněk * 5000)

Graf č.1.: Korelační křivka pro určení potřebné hustoty řasové kultury



Korelační přímka musí být ověřena nejméně jednou ročně nebo při změně podmínek kultivace řas. (ČSN ISO 10 706, 2001)

3.7 Pozorování a měření

Všechny údaje se zaznamenávají do tabulky.

Třikrát týdně byla prováděna obnova media, tyto dny také docházelo ke stanovení a zaznamenávání rozpuštěného kyslíku, teploty, sumy vápníku a hořčíku a hodnoty pH v kontrole a v nejvyšší zkoušené koncentraci.

Do formuláře se vyplňuje i intenzita světla u povrchu zkoušeného roztoku.

Živě narozené potomstvo, vyprodukované každým mateřským organismem, se počítá a odebírá denně, kromě víkendů. Zaznamenává se výskyt mrtvých mateřských organismů, potomků, samců nebo trvalých vajíček. (ČSN ISO 10706, 2001)

3.8 Platnost zkoušky

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

celkový počet organismů v kontrolách, vykazujících mortalitu dospělých a vývoj v samce, je na konci zkoušky $\leq 20\%$,

průměrný počet živých potomků na živý mateřský organismus v kontrole je ≥ 60 ,

variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20%.

Organismy v kontrolách musí být sexuálně dospělé a musí produkovat první potomky do 11 dní od počátku zkoušky, jinak není možné splnit požadavek b). (ČSNISO 10706, 2001)

Má-li být zkouška platná, musí být u kontrolní skupiny (kontrolních skupin) splněna následující kritéria reprodukční schopnosti:

mortalita mateřských organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20%,

střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu živého na konci zkoušky je >60 . (Vyhláška 222/2004)

4 VÝSLEDKY

Zavádění nové laboratorní metody do praxe spočívá v tom, že je potřeba zavést kontrolu, která musí splňovat kritéria pro platnost zkoušky. Kontrola bude vždy probíhat současně při testování určité látky. Pokud by na konci testu nebyla splněna kritéria, která jsou stanovena pro kontrolu, byl by celý test neplatný.

4.1 Zavádění kontroly

V tabulce č. 3 jsou uvedeny podmínky v průběhu zavádění kontroly. V tabulce č. 4 jsou zaznamenány počty narozených potomků v jednotlivých nádobách v průběhu zavádění kontroly. Tabulka č. 5 obsahuje údaje o průměrném počtu narozených potomků na živý mateřský organismus, směrodatnou odchylku a variační koeficient porodnosti.

Tabulka č. 3: Podmínky v průběhu zavádění kontroly

Den testu	0	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Obnova media	x	x		x		x	x		x		x	x		x			
pH K	8,5	8,1		8,2		8,1	8,5		8,3		8,2	8		8			č
pH K		8,4		8,6		8,2	8,4		8,4		8,5	7,9		7,9		8,4	s
O2 (mg/l) K	8,7	9,1		10,35		10,5	8,7		10,3		10	9,9		10			č
O2 (mg/l) K		9,7		8,7		8,5	8,5		8,4		8	8,5		8,7		7,9	s
Teplota (°C)	22	20	21	21	21	22	20	20	22	22	21	22	21	21	21	21	
Datum	15.2.	18.2.	19.2.	20.2.	21.2.	22.2.	25.2.	26.2.	27.2.	28.2.	29.2.	3.3	4.3	5.3	6.3	7.3	

Tabulka č. 4: Počty živých potomků při zavádění kontroly

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	138	0	168	41	0	158	88	180	0	0	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	22	0	22	0	0	20	0	14	0	0	78
	2	0	0	0	0	0	6	0	4	21	0	19	0	30	0	0	80
	3	0	0	0	0	0	19	0	20	0	0	13	30	0	0	0	82
	4	0	0	0	0	0	2	0	0	20	0	25	0	24	0	0	71
	5	0	0	0	0	0	18	0	25	0	0	9	0	25	0	0	77
	6	0	0	0	0	0	16	0	19	0	0	13	26	6	0	0	80
	7	0	0	0	0	0	8	0	24	0	0	17	0	25	0	0	74
	8	0	0	0	0	0	4	0	4	0	0	16	0	26	0	0	50
	9	0	0	0	0	0	18	0	23	0	0	12	32	0	0	0	85
	10	0	0	0	0	0	25	0	27	0	0	14	0	30	0	0	96

Tabulka č. 5: Průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient narozených potomků

Den testu	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	Celkem
Průměr	0	0	0	0	0	14	0	17	4,1	0	16	8,8	18	0	0	77,3
SO	0	0	0	0	0	8,1	0	10	8,6	0	4,6	14	12	0	0	11,75
VC (%)	0	0	0	0	0	59	0	60	211	0	29	162	67	0	0	15,20

Zhodnocení pomocí kritérií, která jsou stanovena pro platnost zkoušky:

mortalita mateřských organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20%. (Vyhláška 222/2004 Sb.)

Toto kritérium bylo splněno.

Střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu živého na konci zkoušky je >60. (Vyhláška 222/2004 Sb.)

Toto kritérium bylo splněno.

Celkový počet organismů v kontrolách, vykazujících mortalitu dospělých a vývoj v samce, je na konci zkoušky $\leq 20\%$. (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium bylo splněno.

Průměrný počet živých potomků na živý mateřský organismus v kontrole je ≥ 60 . (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium bylo splněno.

Variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20%. (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium nebylo splněno.

Závěr: Kontrola splňuje podmínky pro platnost zkoušky, které jsou uvedeny ve vyhlášce č. 222/2004 Sb., ale nesplňuje kritéria platnosti, které jsou uvedeny v ČSN ISO 10706.

4.2 Test s referenční látkou č. 1

V tabulce č. 8 jsou uvedeny podmínky při testu č.1 s referenční látkou. Tabulka č. 6 obsahuje počty narozených potomků v kontrole. Tabulka č. 7 ukazuje průměr narozených potomků za den, směrodatnou odchylku a variační koeficient porodnosti. V tabulkách č. 9, 10, 11, 12, 13 jsou zaznamenány počty potomků narozených v jednotlivých koncentracích. Tabulka č. 14 ukazuje procento inhibice v jednotlivých koncentracích. Aby bylo možné zjistit EC_{50} a EC_{20} byl sestaven graf č.2. z rovnice lineární přímky (která vznikla po proložení bodů, které znázorňují procento inhibice v závislosti na koncentraci) bylo vypočteno EC_{50} a EC_{20} .

Tabulka č. 6: .Kontrola

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	117	0	15	160	0	110	7	0	86	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	14	0	0	18	0	16	0	0	14	62
	2	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	15	0	0	12	0	14	7	0	15	63
	4	0	0	0	0	0	18	0	0	24	0	13	0	0	10	65
	5	0	0	0	0	0	13	0	0	26	0	13	0	0	10	62
	6	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	7	0	0	0	0	0	16	0	0	26	0	8	0	0	11	61
	8	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	13	0	0	20	0	15	0	0	13	61
	10	0	0	0	0	0	16	0	8	21	0	11	0	0	4	60

Tabulka č. 7: Průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient narozených potomků

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	Celkem
Průměr		0	0	0	0	0	15	0	1,1	21	0	13	0,9	0	11	61,86
SO		0	0	0	0	0	1,8	0	3	5	0	2,7	2,3	0	3,7	1,57
VC (%)		0	0	0	0	0	12	0	273	24	0	21	255	0	33	2,54

Tabulka č.8: Podmínky při testu č. 1 s referenční látkou

Den testu	0	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	
Obnova media		x		x		x	x		x		x		x			
pH K	8,25	8,08		8,03		8,25	8,39		8,38		8,50	8,49				č
pH K		8,74		8,18			8,08		8,35			8,45			8,34	s
pH NK	8,22	8,10		8,14		8,27	8,06		8,33		8,50	8,46				č
pH NK		8,88		8,29			8,42		8,35			8,49			8,33	s
O2 (mg/l) K	8,79	8,11		7,73		8,21	8,75		8,60		8,15	7,81				č
O2 (mg/l) K		8,26		7,61			8,06		8,69			8,20			7,70	s
O2 (mg/l) NK	8,88	8,13		7,78		8,62	8,03		8,65		8,24	8,03				č
O2 (mg/l) NK		8,32		7,97			8,81		8,78			8,25			7,92	s
Ca + Mg (mmol/l)	2,09	1,76					1,52		1,71			1,73				
Ca + Mg (mmol/l)		1,62	1,80				1,69		1,60			1,63				
Teplota	21,0	19,5	19,5,0	20,0	19,0	20,0	20,5	19,0	20,0	20,0	19,0	20,0	20,0	20,0	19,0	
Datum	7.3.	10.3	11.3	12.3	13.3	14.3	17.3	18.3	19.3	20.3	21.3	25.3	26.3	27.3	28.3	

Zhodnocení pomocí kritérií, která jsou stanovena pro platnost zkoušky:

mortalita mateřských organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20%. (Vyhláška 222/2004 Sb.)

Toto kritérium bylo splněno.

Střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu živého na konci zkoušky je >60 . (Vyhláška 222/2004Sb.)

Toto kritérium bylo splněno.

Celkový počet organismů v kontrolách, vykazujících mortalitu dospělých a vývoj v samce, je na konci zkoušky $\leq 20\%$. (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium nebylo splněno.

Průměrný počet živých potomků na živý mateřský organismus v kontrole je ≥ 60 . (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium bylo splněno.

Variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20%. (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium nebylo splněno.

Závěr: Kontrola splňuje podmínky pro platnost zkoušky, které jsou uvedeny ve vyhlášce č. 222/2004 Sb., ale nesplňuje kritéria platnosti, které jsou uvedeny v ČSN ISO 10706.

Tabulka č. 9: Koncentrace 0,01 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	86	10	22	132	0	91	0	3	9	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	0	10	0	14	0	10	0	3	0	37
	2	0	0	0	0	0	15	0	0	27	0	13	0	0	0	55
	3	0	0	0	0	0	14	0	0	19	0	11	0	0	5	49
	4	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	5	0	0	0	0	0	10	0	22	0	0	9	0	0	3	44
	6	0	0	0	0	0	15	0	0	29	0	17	0	0	0	61
	7	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	8	0	0	0	0	0	16	0	0	19	0	17	0	0	1	53
	9	0	0	0	0	0	16	0	0	24	0	14	0	0	0	54
	10	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	0

Tabulka č. 10: Koncentrace 0,05 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	67	0	42	76	0	66	0	0	6	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	4	0	0	0	0	0	15	0	14	0	0	13	0	0	5	47
	5	0	0	0	0	0	12	0	0	27	0	9	0	0	0	48
	6	0	0	0	0	0	17	0	28	0	0	17	0	0	1	63
	7	0	0	0	0	0	8	0	0	21	0	11	0	0	0	40
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	15	0	0	28	0	16	0	0	0	59

Tabulka č. 11: Koncentrace 0,1 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	88	23	24	63	19	56	16	12	24	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	13	0	0	23	0	7	0	0	6	49
	2	0	0	0	0	0	16	0	0	0	19	0	16	0	0	51
	3	0	0	0	0	0	15	0	22	0	0	9	0	12	0	58
	4	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	5	0	0	0	0	0	12	23	1	0	0	7	0	0	6	49
	6	0	0	0	0	0	12	0	0	19	0	12	0	0	3	46
	7	0	0	0	0	0	11	0	0	21	0	9	0	0	0	41
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	10	0	0	0	0	0	9	0	1	0	0	12	0	0	9	31

Tabulka č. 12: Koncentrace 0,2 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	47	8	0	62	18	56	14	16	0	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	12	0	0	21	0	18	0	0	0	51
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	12	0	15	0	35
	4	0	0	0	0	0	8	0	0	21	0	14	0	0	0	43
	5	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	14	0	0	20	0	12	0	0	0	46
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	13	0	0	0	18	0	14	1	0	46

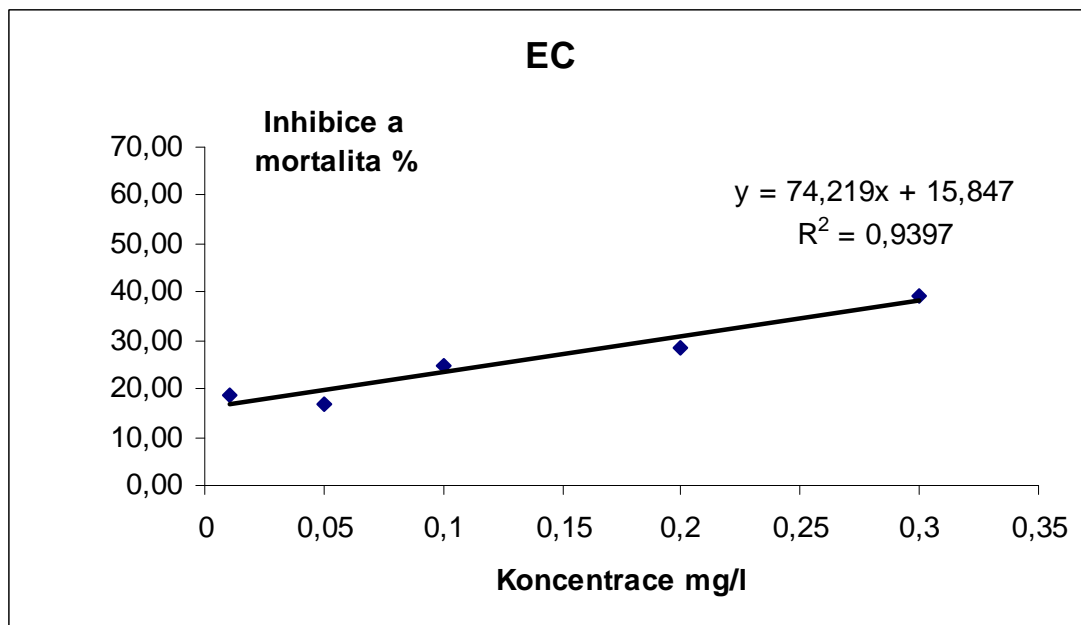
Tabulka č. 13: Koncentrace 0,3 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	16	0	0	34	0	25	0	0	0	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	13	0	0	20	0	13	0	0	0	46
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	3	0	0	14	0	12	0	0	0	29
	5	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka č. 14: Procento inhibice v jednotlivých koncentracích

Koncentrace (mg/l)		0,01	0,05	0,1	0,2	0,3
Nádoba	1	37	s	49	51	46
	2	55	s	51	s	s
	3	49	s	58	35	0
	4	s	47	s	43	29
	5	44	48	49	s	s
	6	61	63	46	0	0
	7	s	40	41	46	0
	8	53	s	s	s	s
	9	54	0	s	0	0
	10	s	59	31	46	0
Suma		353	257	325	221	75
Průměr		50,43	51,40	46,43	44,20	37,50
Inhibice (%)		18,47	16,90	24,94	28,54	39,37

Graf č.2: Úhyn nebo imobilizace v závislosti na koncentraci K₂Cr₂O₇



21dEC₂₀ = 0,056

21dEC₅₀ = 0,46

4.3 Test s referenční látkou č. 2

V tabulce č. 15 jsou uvedeny podmínky při testu č.2 s referenční látkou. V tabulkách č. 16 – 21 jsou zaznamenány počty narozených potomků v kontrole a v jednotlivých koncentracích.

Tabulka č.15: Podmínky při testu č.2 s referenční látkou

Den testu	0	3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Obnova media	x	x		x		x	x		x		x	x		x			
pH kontrola	8,42	8,47		8,47		8,50	8,05		8,45		8,46	8,50		8,46			č
pH kontrola		8,49		8,49		8,34	8,68		8,15		8,40	8,75		8,40		8,34	s
pH (mg/l) NK	8,50	8,41		8,34		8,49	8,42		8,38		8,50	8,50		8,49			č
pH (mg/l) NK		8,43		8,45		8,41	8,54		8,10		8,38	8,49		8,61		8,33	s
O2 (mg/l) K	8,05	8,03		7,60		7,66	8,62		8,55		8,60	8,59		8,52			č
O2 (mg/l) K		8,00		7,60			8,60		8,00		8,20	8,79		8,56		7,70	s
O2 (mg/l) NK	8,09	8,09		7,57		7,68	8,78		8,75		8,52	8,60		8,63			č
O2 (mg/l) NK		8,21		7,50		7,90	8,72		8,08		8,21	8,47		8,65		7,92	s
Ca + Mg (mmol/l)				1,77					1,62					1,72			
Ca + Mg (mmol/l)				1,56					1,70					1,63			
Teplota	18,0	19,0	20,0	18,3	18,5	17,5	19,5	18,2	17,6	18,5	19,5	19,8	20,0	18,5	17,5	18,0	
Datum	28.3	31.3	1.4.	2.4.	3.4.	4.4.	7.4.	8.4.	9.4.	10.4	11.4	14.4	15.4	16.4	17.4	18.4	

Tabulka č. 16: .Kontrola

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	6	8	3	2	6	21	7	4	10	1	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	6	0	3	0	0	0	0	0	0	0	9
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	4	0	0	0	0	0	0	5	0	2	0	0	0	0	0	1	8
	5	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	0	0	0	14
	7	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	4	3	0	14
	9	0	0	0	0	0	0	3	0	0	6	7	0	0	7	0	23
	10	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0

Zhodnocení pomocí kritérií, která jsou stanovena pro platnost zkoušky:

mortalita mateřských organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20%. (Vyhláška 222/2004 Sb.)

Toto kritérium nebylo splněno.

Střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho matečného organismu živého na konci zkoušky je >60. (Vyhláška 222/2004Sb.)

Toto kritérium nebylo splněno.

Celkový počet organismů v kontrolách, vykazujících mortalitu dospělých a vývoj v samce, je na konci zkoušky $\leq 20\%$. (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium nebylo splněno.

Průměrný počet živých potomků na živý mateřský organismus v kontrole je ≥ 60 . (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium nebylo splněno.

Variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20%. (ČSN ISO 10706, 2001)

Toto kritérium nebylo splněno.

Závěr: Kontrola nesplňuje podmínky pro platnost zkoušky, které jsou uvedeny ve vyhlášce č. 222/2004 Sb. a ani nesplňuje kritéria platnosti, které jsou uvedeny v ČSN ISO 10706.

Tabulka č. 17: Koncentrace 0,01 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	10	2	11	0	6	12	13	0	9	3	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	4	0	7	0	0	5	7	0	0	0	23
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	4	0	4	0	0	7	6	0	0	3	24
	4	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	5	0	0	0	0	0	2	2	0	0	6	0	0	0	9	0	19
	6	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	7	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	10	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0

Tabulka č. 18: Koncentrace 0,05 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	1	0	5	0	7	11	6	7	4	4	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	5	4	0	4	0	18
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	5	6	2	0	0	4	18
	4	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	5	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	6	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	7	0	0	9
	8	0	0	0	0	0	0	s	s	s	s		s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	10	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0

Tabulka č. 19: Koncentrace 0,1 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	4	0	8	0	0	14	15	0	6	24	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	2	0	5	0	0	5	6	0	1	10	29
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	4	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9
	6	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	4	4	0	0	5	15
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	5	5	0	5	0	18
	10	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0

Tabulka č. 20: Koncentrace 0,2 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	2	12	3	0	6	12	2	0	17	2	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	2	8	3	0	3	8	2	0	7	2	35
	2	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	3	0	0	0	0	0	0	4	0	0	3	4	0	0	10	0	21
	4	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	7	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	10	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0

Tabulka č. 21: Koncentrace 0,3 K₂Cr₂O₇ [mg/l]

Den testu		3	4	5	6	7	10	11	12	13	14	17	18	19	20	21	
Počet živých potomků		0	0	0	0	0	12	0	23	4	2	29	8	12	10	4	Celkem
Nádoba	1	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	4	0	0	0	3	10
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	3	0	0	11
	4	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	5	0	0	0	0	0	8	0	12	0	0	0	0	4	4	0	28
	6	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	10	1	0	15	4	0	2	0	32
	8	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0
	9	0	0	0	0	0	4	0	1	1	1	6	0	5	4	1	23
	10	0	0	0	0	0	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	0

5 DISKUSE

5.1 Zavádění kontroly

Při zavádění kontroly byly dodrženy všechny podmínky v průběhu testu. Jediné kritérium pro platnost zkoušky, které nebylo při zavádění kontroly splněno, bylo, že variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20%. Kontrola tedy splňuje požadavky kladené vyhláškou 222/2004 Sb, ale nespĺňuje podmínky ČSN ISO 10706.

5.2 Test č. 1 s referenční látkou

Při prvním testu s referenční látkou (dichromanem draselným) byly dodrženy všechny podmínky v průběhu testu. Nebyla splněna dvě kritéria pro platnost zkoušky:

celkový počet organismů v kontrolách, vykazujících mortalitu dospělých a vývoj v samce, je na konci zkoušky $\leq 20\%$. (ČSN ISO 10706, 2001),

variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20%. (ČSN ISO 10706, 2001). Test tedy splňuje požadavky kladené vyhláškou č. 222/2004 Sb., ale nespĺňuje podmínky ČSN ISO 10706.

5.3 Test č. 2 s referenční látkou

Při druhém testu s referenční látkou (dichromanem draselným) nebyla dodržena jedna z podmínek v průběhu testu. Teplota při tomto testu se pohybovala od 17,5°C do 20,0°C, což nespĺnilo požadavek, že teplota při zkoušce se má udržovat v rozsahu 18°C až 22°C a v průběhu zkoušky nesmí kolísat o více než 2°C. V důsledku toho došlo k nízké reprodukci potomků.

Pohlaví je určováno před narozením (Mitchell, 2001). Z toho plyne, že podmínky, které ovlivňují vývoj v samce, byly přítomny i v místnosti s chovem Dafnií.

5.4 Variační koeficient

Kritérium: variační koeficient porodnosti (počtu potomků na mateřský organismus za den) v kontrolách nepřesahuje 20% (ČSN ISO 10706), nebylo splněno ani v jedné z kontrol. Toto kritérium se mi jeví jako nesmyslné a i v budoucnu nesplnitelné. Znamenalo by to, že v případě, že dojde jeden den k narození více jak jednoho potomka u jednoho mateřského organismu, již není možno toto kritérium splnit a test je proto neplatný.

5.5 Přítomnost samců

V podmínkách kladených na zkušební organismus je uvedeno, že organismy pocházejí ze zdravé zásobní kultury, nevykazující žádné známky stresu, mezi něž patří i výskyt samců. Přesto se v OECD TG 211, ČSN ISO 10706 a vyhlášce č. 222/2004 Sb. počítá se zpracováváním výsledků z kultur, kde se samci vyskytují.

5.6 Kladné stránky metody

Chronické testy toxicity se od testů akutní toxicity liší dobou působení látky na organismus. Testy akutní toxicity ukazují pouze krátkodobé působení látek na organismus, ale nepostihují kumulativní účinky látek v organismu. Testy chronické toxicity proto mají větší vypovídající schopnost o tom, jak bude daná látka působit na organismy v životním prostředí.

5.7 Záporné stránky metody

Výsledky, které vyplynou z aplikace této metody, mají z legislativního hlediska pouze malé uplatnění. Ve vztahu k odpadům tyto výsledky neslouží jako kritérium pro stanovení vlastnosti H14 ekotoxicita. Ve vztahu k chemickým látkám je uplatnění testů toxicity dané vyhláškou č. 232/2004Sb. při klasifikaci látek jako nebezpečných pro životní prostředí. Toto uplatnění však není velké (viz. kap. 2.2.1.).

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zavést metodu stanovení chronické toxicity na *Daphnia magna* Straus. V rámci této diplomové práce byla provedena jedna samostatná kontrola a dvě kontroly spolu s testy s referenční látkou (dichromanem draselným). Ve dvou kontrolách byly splněny kritéria pro platnost zkoušky podle vyhlášky č. 222/2004 Sb. Ve třetí kontrole nedošlo ke splnění těchto kritérií, vzhledem k početnému výskytu samců a pomalé reprodukci samičích mateřských organismů. Pro snazší obhajobu této metody před akreditační komisí bych doporučila tento test zopakovat.

V průběhu zavádění metody došlo k výskytu několika nejasností, které se týkali neshod v legislativě (viz. 2.2.3.,2.2.4). Vzhledem k těmto odlišnostem bych doporučila ČSN ISO 10706 aktualizovat a zvážit, zda jsou kritéria platnosti nastavena správně.

7 SEZNAM LITERATURY

- [1] ČSN ISO 10706: 2001, Jakost vod – Stanovení chronické toxicity látek pro *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)
- [2] OECD Guidelines For Testing Of Chemicals 211, 1998: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD, Paris.
- [3] TICHÝ, M., 2003: Toxikologie pro chemiky – toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa, Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- [4] ČSN EN ISO 6341/1997, Jakost vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity.
- [5] Hartman P. [ed.], 1998: Hydrobiologie. In: Příkryl I. [ed.], Členovci. – Informatorium, spol. s r. o., Praha. 144 – 146.
- [7] Maršálek B., 2008a :Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití. – Oddělení experimentální fykologie a ekotoxikologie, Botanický ústav AV ČR, Brno, online:
http://recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_prezentace/Rozdeleni_EB.pdf.
- [8] Čabala R., 2007: Ekotoxikologie. Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova v Praze, Praha, online: <http://www.natur.cuni.cz/analchem/nesmerak/20070806NH1.pdf>, cit. 14.3.2008.
- [9] Vyhláška 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků, Ministerstvo průmyslu a obchodu, Praha, částka 76.
- [10] Maršálek B., 2008b: Mikrobiotesty. – Botanický ústav AV ČR, Brno, 42s.
- [11] Matějů V. [ed.], 2007: Stanovení ekotoxicity. – Biotechnologická divize Praha, Praha, online: http://www.waste.cz/waste.php?clanek=04-05/Stanoveni_ekotoxicity.htm

- [12] Heringová I., 2005: Komparativní posouzení komerčních povrchově aktivních látek. – Univerzita Pardubice, Pardubice, 72s.
- [13] Mitchell S., 2001: Intersex and male development in *Daphnia magna*. – *Hydrobiologia*: 145 – 156.
- [14] Kočí V., Haloušková O., 2002: Vodní zdroje EKOMONITOR spol. s r. o. Ekotoxikologické biotesty 1, Sborník pracovních konferencí. Praha: VŠCHT Praha.
- [15] Heteša, J., Sukop, I., 1985: Aplikovaná hydrobiologie II. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 84 s.
- [16] Metodický pokyn odboru odpadů ke stanovení ekotoxicky odpadů, duben 2007: *Věstník MŽP*, ročník XVII, částka 4.
- [17] Svobodová, Z., et al., 2003: Veterinární toxikologie: Praktická cvičení část I. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, 179 s.
- [18] Kroupová, H., 2004: Posouzení toxického vlivu dusitanů na rybí obsádku. Praha, Diplomová práce na Vysoké škole chemicko – technologické v Praze.
- [19] Sukop, I., 1998: Aplikovaná hydrobiologie. MZLU, Brno, 145 s.
- [20] Kozumplíková M., 2006: Ekotoxikologické posouzení komerčního probiopreparátu a ověření jeho vlivu na příjem fosforu směsnou kulturou aktivovaného kalu a sladkovodní řasou. – Univerzita Pardubice, Pardubice, 87s.
- [21] Benediktová K., 2008: Akutní testy toxicity na žábřonožkách *Artemia Salina*. – Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Hradec Králové. 20.
- [22] Zákon č. 356/2003 Sb., o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů Minimální koncentrace nebezpečných látek, které se berou v úvahu při klasifikaci látek a přípravků, Parlament České republiky, Praha, částka 120.
- [23] Vyhláška 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí, Ministerstvo životního prostředí, Praha, příloha č.2.

[24] Vyhláška 376/2001 Sb., o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, Ministerstvo životního prostředí a Ministerstvo zdravotnictví, Praha, příloha č. 1 a č.3.

8 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Formulář k zavádění kontroly

Příloha č. 2: Formulář pro test č. 1 s referenční látkou

Příloha č. 3: Formulář pro test č. 2 s referenční látkou

Příloha č. 4: Formulář pro stanovení akutní toxicity na *Daphnia magna*