

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

ÚSTAV EKOLOGIE A CHOROB ZVĚŘE, RYB A VČEL

Standardní operační postup - SOP 02

Terestrické testy ekotoxicity

Stanovení inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*)

1. Cíl

Tento test slouží ke stanovení vlivu půdních kontaminantů a chemických látek na reprodukci chvostoskoka *Folsomia candida* v definovaném umělém půdním substrátu.

2. Charakteristika testu

Test bude prováděn s chvostoskokem *Folsomia candida* dle normy ČSN ISO EN 11267 a OECD 232. Princip testu spočívá v tom, že je určitý počet jedinců chvostoskoků vystaven řadě ředění kontaminované půdy nebo rozsahu koncentrací zkoušené látky a sleduje se vliv na jejich přežití a reprodukci.

3. Materiál

3.1 Testovací organismy

Folsomia candida – juvenilní jedinci ve stáří 10–12 dní

3.2 Chemikálie a suroviny

- Černá tuš
- Kyselina boritá
- Artificiální substrát - umělá půda připravená dle směrnice OECD (křemenný písek, kaolinitový jíl, rašelina, CaCO₃)

3.3. Kontrola – umělé půdy

Jako kontrola se použije uměle připravená směs se zaručenou konstantní kvalitou dle směrnice OECD. Kontrolní půda se připraví smícháním a důkladnou homogenizací 69 % hmotnostních křemenného písku, 20 % hm. kaolinitového jílu, 10 % hm. rašeliny a 1% hm. CaCO₃ pro úpravu celkového pH na 6,0 ± 0,5. Vodní kapacita půdy (WHC) je udržována v rozmezí 40–60 %.

3.4. Přístroje a pomůcky

- Zkušební nádoby - skleněné lahve s polyethylenovým víčkem
- parafilm
- analytické váhy
- dechový exhaustor (odsávačka)
- temperovaná kultivační komora s osvětlením
- pH metr
- nastavitelné automatické pipety
- Petriho misky
- fotoaparát s makroobjektivem

4. Podmínky testu

- juvenilní jedinci *Folsomia candida* ve stáří 10–12 dní
- množství zkoušené směsi či kontroly v jedné nádobě: 30 g
- 10 chvostoskoků na zkušební nádobu
- krmení: sušené pivovarské kvasnice, množství přizpůsobit příjmu potravy
- teplota: 20 ± 2 °C
- pH 6,0 ± 0,5
- vlhkost umělé půdy i zkoušené směsi: 40–60 %
- osvětlení: fotoperioda 16 h světlo/8 h tma
- délka expozice: 28 dní

5. Pracovní postup

Před samotným testem je potřeba si připravit synchronizovanou kulturu chvostoskoků. Na čerstvý substrát se pomocí dechového exhaustoru přemístí adultní jedinci z chovu, což obvykle spouští ovipozici. Za 3 dny se dospělí jedinci odstraní a v kultivační nádobě zůstanou pouze vajíčka. Za 12 dní se z vajíček vylíhnou juvenilní jedinci, kteří se použijí pro zkoušku.

Tento dokument vznikl za podpory projektu IVA FVHE VFU Brno č. 2018FVHE/2190/33.

Řešitelé: Mgr. Daniela Hlávková a Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.

- Připravíme koncentrační řadu testované látky (3 - 5 koncentrací)
- do zkušebních nádob navážíme po 30 g předem připravené umělé půdy
- půdu kontaminujeme připravenými koncentracemi testované látky
- kontrolu tvoří umělá půda bez přídavku testované látky
- pomocí dechového exhaustoru přeneseme do zkušebních nádob 10 juvenilních jedinců *Folsomia candida*
- na začátku testu a po 14 dnech přidáme do testovacích nádob špetku sušených pivovarských kvasnic
- zkušební nádoby s chvostokoky překryjeme parafilmem (potravinářskou fólií) a vložíme do inkubátoru
- dvakrát týdně parafilm odkryjeme (provzdušnění nádoby).

Test probíhá v inkubační místnosti při teplotě 20 ± 2 °C. Po 28 dnech expozice se počítá počet jedinců.



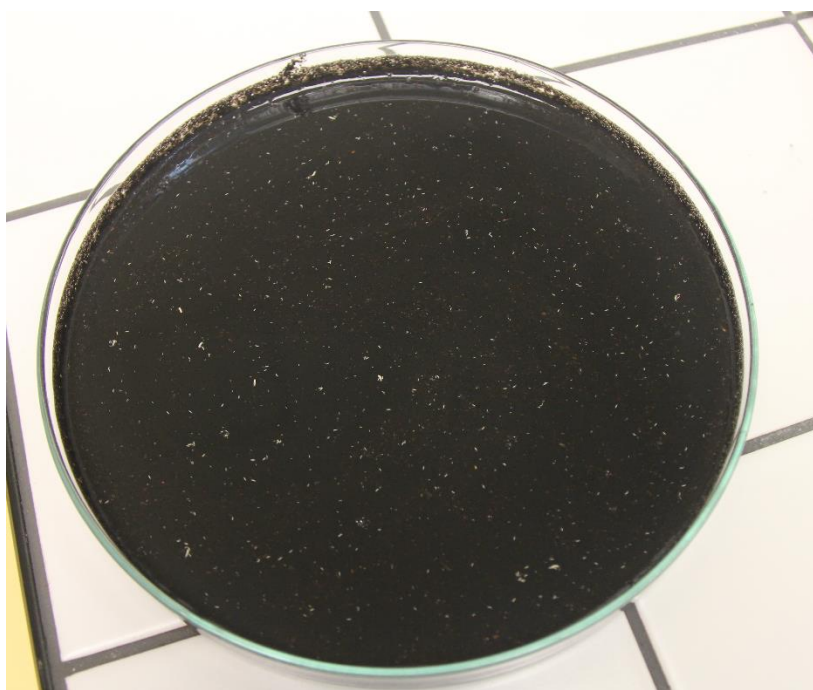
Obrázek č. 1: Laboratorní inkubátor

6. Test na standardu

Jednou ročně se chvostokoci testují na referenční látku, zda laboratorní podmínky neovlivnily citlivost testu. Touto referenční látkou je kyselina boritá. Navržená rozpětí hodnot EC_{50} kyseliny borité jsou 50–200 mg/kg.

7. Vyhodnocení testu

- Do každé testovací nádoby přidáme cca 50 ml destilované vody a obsah zlehka promícháme skleněnou tyčinkou
- obsah nádoby přelijeme do 100 ml Petriho misky a obarvíme několika kapkami černé tuše (světlá barva chvostoskoků je pak dobře viditelná na tmavém pozadí)
- povrch vodní hladiny s chvostoskoky vyfotografujeme a na pořízeném snímku spočítáme počet dospělců a juvenilů.



Obrázek č. 2: Chvostoskoci po obarvení černou tuší

Výsledné hodnoty reprodukčních parametrů jedinců vystavených zkoušené směsi se porovnají s hodnotami reprodukčních výsledků v kontrole, vypočítá se inhibice reprodukce v procentech, mortalita dospělců v procentech a následně hodnota 28dEC₅₀ (efektivní koncentrace, která vyvolá po 28 dnech expozice 50% inhibici reprodukce testovaných jedinců).

8. Validace testu

Výsledky se považují za platné, jestliže jsou splněny následující podmínky:

- počet narozených jedinců v jednotlivých kontrolních nasazeních musí dosáhnout alespoň 100 ks,

Tento dokument vznikl za podpory projektu IVA FVHE VFU Brno č. 2018FVHE/2190/33.

Řešitelé: Mgr. Daniela Hlávková a Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.

- koeficient variace reprodukce v kontrolních paralelních nasazeních nesmí být větší než 30 %,
- průměrná mortalita dospělců na konci testu v kontrolních paralelních nasazeních nesmí být větší než 20 %.

9. Použitá literatura

OECD GUIDLINE 232 (2009): Collembolan Reproduction Test in Soil.

ČSN ISO 11267 (2014): Kvalita půdy – Inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*) látkami znečišťujícími půdu.