

VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VODOHOSPODÁŘSKÝ
T.G. MASARYKA

veřejná výzkumná instituce

Hodnocení stavu povrchových vod pomocí effect-based metod

Jméno řešitele

RNDr. Přemysl Soldán, Ph.D. a kol.



Hodnocení stavu povrchových vod pomocí effect-based metod

RNDr. Přemysl Soldán, Ph.D. a kol.

Název a sídlo organizace:

Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i.
Podbabská 30, 160 00 Praha 6

Ředitel:

Ing. Tomáš Fojtík

Zadavatel:

Technologická agentura České republiky
Evropská 2589/33b, 160 00 Praha 6

Zahájení a ukončení úkolu:

leden 2021 – prosinec 2023

Místo uložení zprávy:

SVTI VÚV TGM, v.v.i.

Náměstek ředitele pro výzkumnou a odbornou činnost:

Ing. Libor Ansorge, PhD.

Vedoucí odboru:

Ing. Robert Kořínek, Ph.D.

Vedoucí oddělení:

RNDr. Přemysl Soldán, Ph.D.

Vedoucí řešitel zakázky:

RNDr. Přemysl Soldán, Ph.D.

Spoluřešitelé a spolupracovníci

Mgr. Ondřej Sabol

Obsah:

1	Úvod	5
2	Použité odkazy	6
3	Předmět metodiky	8
4	Struktura metodiky	8
A.	ODBĚR VZORKŮ A JEJICH PŘEDÚPRAVA	9
	A.1 Přístroje a zařízení	9
	A.2 Činidla	9
	A.3 Odběr vzorků	9
	A.4 Manipulace s odebranými vzorky.....	10
	A.5 Předúprava vzorků	10
	A.5.1 Předčištění sorbentů	10
	A.5.2 Příprava koncentrátu znečištění	10
	A.6 Odkazy na normy	11
B.	STANOVENÍ CHRONICKÝCH ÚČINKŮ ZNEČIŠTĚNÍ	12
	B.1 Chronická toxicita	12
	B.1.1 Podstata zkoušky	12
	B.1.2 Zkušební organismus	12
	B.1.3 Přístroje a zařízení	12
	B.1.4 Roztoky a činidla	12
	B.1.5 Postup stanovení.....	13
	B.1.6 Posouzení rizika chronické toxicity.....	17
	B.1.7 Kontrola řízení kvality	17
	B.1.8 Odkazy na normy	17
	B.2 Herbicidní účinek	17
	B.2.1 Podstata zkoušky	17
	B.2.2 Zkušební organismus	18
	B.2.3 Přístroje a zařízení	18
	B.2.4 Činidla a roztoky	18
	B.2.5 Postup zkoušky.....	20
	B.2.6 Posouzení rizika herbicidních účinků	22
	B.2.7 Kontrola řízení kvality	22
	B.2.8 Dlouhodobé uchovávání řas.....	22
	B.2.9 Odkazy na normy	22

B.3 Genotoxicita	23
B.3.1 Podstata zkoušky	23
B.3.2 Princip zkoušky.....	23
B.3.3 Zkušební organismus	23
B.3.4 Přístroje a zařízení	23
B.3.5 Roztoky a média.....	24
B.3.6 Postup zkoušky.....	28
B.3.7 Posouzení rizika mutagenních účinků	33
B.3.8 Kontrola řízení kvality	33
B.3.9 Stanovení cytotoxicity (volitelné).....	33
B.3.10 Příprava zásobní kultury (volitelné).....	34
B.3.11 Odkazy na normy	35
B.4 Estrogenní účinek.....	36
B.4.1 Podstata zkoušky	36
B.4.2 Zkušební organismus	36
B.4.3 Přístroje a materiál	36
B.4.4 Postup zkoušky.....	37
B.4.5 Posouzení rizika estrogenních účinků	37
B.4.6 Kontrola řízení kvality	37
B.4.7 Odkazy na normy	37
C. URČENÍ CHARAKTERU TLAKŮ	38

1 Úvod

Rámcová směrnice o vodách (RSV) [1] v článku 5, článku 8 a příloze II v bodech 1.4 a 1.5 ukládá členským státům EU povinnost identifikace významných antropogenních vlivů, která slouží jako základ pro vypracování monitorovacích programů a programů opatření. Postupy provedení této identifikace specifikuje Společná strategie k implementaci Rámcové směrnice ES o vodní politice (2000/60/ES), Pokyny č. 3 Analýza tlaků a posouzení dopadů [2].

Z hlediska RSV jsou monitorovací programy rozděleny do tří kategorií: situační monitoring, provozní monitoring a průzkumný monitoring. Programy situačního a provozního monitoringu by měly být stanoveny na základě charakterizace vodního útvaru a posouzení tlaků a dopadů, vyžadovaného podle (viz RSV příloha V bod 1.3.). V této směrnici je rovněž popsán mechanismus, který v určitých případech spouští průzkumný monitoring.

V ČR monitoring probíhá v souladu s požadavky Vodního zákona [3]. V §21, odstavci 1 je uvedeno: „Zjišťování a hodnocení stavu povrchových a podzemních vod slouží k zajišťování podkladů pro výkon veřejné správy podle tohoto zákona, plánování v oblasti vod a k poskytování informací veřejnosti a provádí se podle povodí povrchových vod a hydrogeologických rajonů podzemních vod“. Pravidla provádění monitoring pak specifikuje Vyhláška č. 98/2011 [4]. U vodních útvarů je z výsledků monitoringu stanovován jejich chemický a ekologický stav. Chemický stav vodního útvaru ovlivňuje jeho ekologický stav. Hlavním účelem monitorovacích programů je poskytnout nezbytné informace pro návrhy efektivních programů opatření k ochraně dobrého či zlepšení nevyhovujícího stavu vodních útvarů.

Chemický stav vodního útvaru určují výsledky průměrných hodnot koncentrací vybraných znečišťujících látek, detekovaných situačním monitoringem za tříleté období sledování. Předpokladem je, že při znalosti možných negativních biologických účinků látek lze z výsledků cílených analýz vydedukovat faktory / rizika, ovlivňující ekologický stav vodního útvaru. Takové hodnocení rizik má však významná omezení. Seznam látek, podléhajících sledování, se známými negativními účinky, se neustále rozšiřuje a s tím úměrně stoupají náklady na provádění chemického monitoringu. Biologickou jakost vod však ovlivňují vlastnosti celkového znečištění, jehož výsledný účinek je dán biologickými vlastnostmi směsi látek, v něm obsažených, možnými produkty vzájemných reakcí těchto látek, nebo metabolity a transformačními produkty, vznikajícími působením organismů. Tak široké spektrum látek nelze cíleným monitoringem zachytit i při hypotetické možnosti naplnění tohoto požadavku ze získaných dat není reálně možné kvalifikovaně výsledný biologický účinek celkového znečištění vod kvalifikovaně odhadnout. Tím je vypovídací schopnost mnohdy značně nákladně získaných dat pro potřeby návrhů opatření na ochranu vodních útvarů výrazně omezena.

Ekologický stav se hodnotí na základě výsledků ekologického průzkumu stavu ekosystémů daného vodního útvaru. Způsob jeho provedení specifikují Ministerstvem životního prostředí schválené metodiky, popisující postupy inventarizace různých složek ekosystémů. Při hodnocení ekologického stavu se zohledňují rovněž koncentrace vybraných polutantů a některé fyzikální vlastnosti vod. Ekologický stav sice dobře popisuje ekologické vlastnosti vodního útvaru, mnohdy však příčiny daného stavu nejsou jasné, což ztěžuje možnosti tvorby opravdu efektivního návrhu opatření na jeho ochranu.

Odhalit možné příčiny, určující ekologický stav vodního útvaru, lze pomocí sady biologických zkoušek, tak zvaných effect-based methods (EBM). To jsou specializovaná biologická stanovení, která se používají k detekci potenciálu chemických látek, jejich směsí či metabolitů, obsažených v celkovém znečištění vod, negativně působit na organismy. Použití EBM v monitoringu tedy umožňuje určit typy negativního biologického působení znečištění a na základě znalostí, jaké skupinách látek dané účinky mohou způsobovat, lépe zaměřit chemické analýzy na tyto látky v rámci průzkumného monitoringu. Zařazení EBM do monitorovacích programů tedy výrazně zvyšuje efektivitu činností, zaměřených na ochranu vod. Toto konstatování je plně v soulase s doporučeními odborných statí, zabývajících se zlepšením detekční schopnosti monitoringu z hlediska hledání příčin nevyhovujícího stavu vod (např. [5-12]).

2 Použité odkazy

[1] Směrnice Evropského parlamentu a rady 2000/60/ES ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. Dostupné z. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000L0060>. [citováno: 2024-01-30]

[2] Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC), Guidance Document No 3 Analysis of Pressures and Impacts, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2003, 148 pp., ISBN 92-894-5123-8 ISSN 1725-1087. Dostupné z. [https://circabc.europa.eu/sd/a/7e01a7e0-9ccb-4f3d-8cec-aeef1335c2f7/Guidance%20No%203%20-%20pressures%20and%20impacts%20-%20IMPRESS%20\(WG%202.1\).pdf](https://circabc.europa.eu/sd/a/7e01a7e0-9ccb-4f3d-8cec-aeef1335c2f7/Guidance%20No%203%20-%20pressures%20and%20impacts%20-%20IMPRESS%20(WG%202.1).pdf). [citováno: 2024-01-30]

[3] Zákon č. 254/2001 Sb. o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon) ve znění pozdějších předpisů

[4] Vyhláška č. 98/2011 Sb. o způsobu hodnocení stavu útvarů povrchových vod způsobu hodnocení ekologického potenciálu silně ovlivněných a umělých útvarů povrchových vod a náležitostech programů zjišťování a hodnocení stavu povrchových vod

[5] Technical report on aquatic effect-based monitoring tools, European Commission, Directorate-General for Environment, Technical report on aquatic effect-based monitoring tools, Publications Office, 2014, <https://data.europa.eu/doi/10.2779/72812>

[6] Doyle E., Biales A., Focazio A., Griffin D., Loftin K and Wilson V. Effect-Based Screening Methods for Water Quality Characterization Will Augment Conventional Analyte-by-Analyte Chemical Methods in Research As Well As Regulatory Monitoring, Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 24, 13906–13907. <https://doi.org/10.1021/es5053254>

[7] Brack, W., Aissa, S. A., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B. I., Faust, M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Müller, C., Munthe, J., Posthuma, L., Seiler, T-B., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Tindall, A. J., de Aragão Umbuzeiro, G., Zhang, X. & Altenburger, R.. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. Environ Sci Eur 31, 10, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2>

- [8] De Baat M.L., Kraak M.H.S., R., Van der Oost R., De Voogt P., Verdonschot P.F.M. Effect-based nationwide surface water quality assessment to identify ecotoxicological risks, *Water Research*, 159 (2019): 434-443. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.040>
- [9] Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive; Report to the Common Implementation Strategy (CIS), Working Group Chemicals, Subgroup Effect-Based Methods (EBM), 2021, 163 pp. Dostupné z. https://www.normandata.eu/sites/default/files/files/Highlights/211013_EBM%20report_FINAL_WG_Chem_Oct_2021%20%281%29.pdf. [citováno: 2024-01-30]
- [10] Neale, P.A., Escher B.I., de Baat M.L., Dechesne M., Deere D.A., Enault J., Kools S.A.E., Loret J-F., Smeets P.W.M.H., Leusch F.D.L.. Effect-based monitoring to integrate the mixture hazards of chemicals into water safety plans, *J Water Health* (2022), 20 (12):1721–1732, <https://doi.org/10.2166/wh.2022.165>.
- [11] Neale, P.A., Escher B.I., de Baat M.L., Dechesne M., Dingemans M.M.L., Enault J., Pronk G.J., Smeets P.W.M.H., Leusch F.D.L.. Application of Effect-Based Methods to Water Quality Monitoring: Answering Frequently Asked Questions by Water Quality Managers, Regulators, and Policy Makers. *Environ Sci Technol*. 2023 Apr 18;57(15):6023-6032. doi: 10.1021/acs.est.2c06365. Epub 2023 Apr 7. PMID: 37026997.
- [12] Neale PA, Escher BI, de Baat ML, Enault J, Leusch FDL. Effect-Based Trigger Values Are Essential for the Uptake of Effect-Based Methods in Water Safety Planning. *Environ Toxicol Chem*. 2023 Mar;42(3):714-726. doi: 10.1002/etc.5544. Epub 2023 Feb 8. PMID: 36524849.

3 Předmět metodiky

Metodika specifikuje postup stanovení možných negativních biologických vlivů celkového znečištění vod pomocí specializovaných metod, detekujících dlouhodobé (chronické) účinky znečištění jako je chronická toxicita, herbicidní účinky, genotoxicita a estrogenita. Dále popisuje využití získaných výsledků k bližšímu určení tlaků, které ovlivňují ekologický stav vodního útvaru.

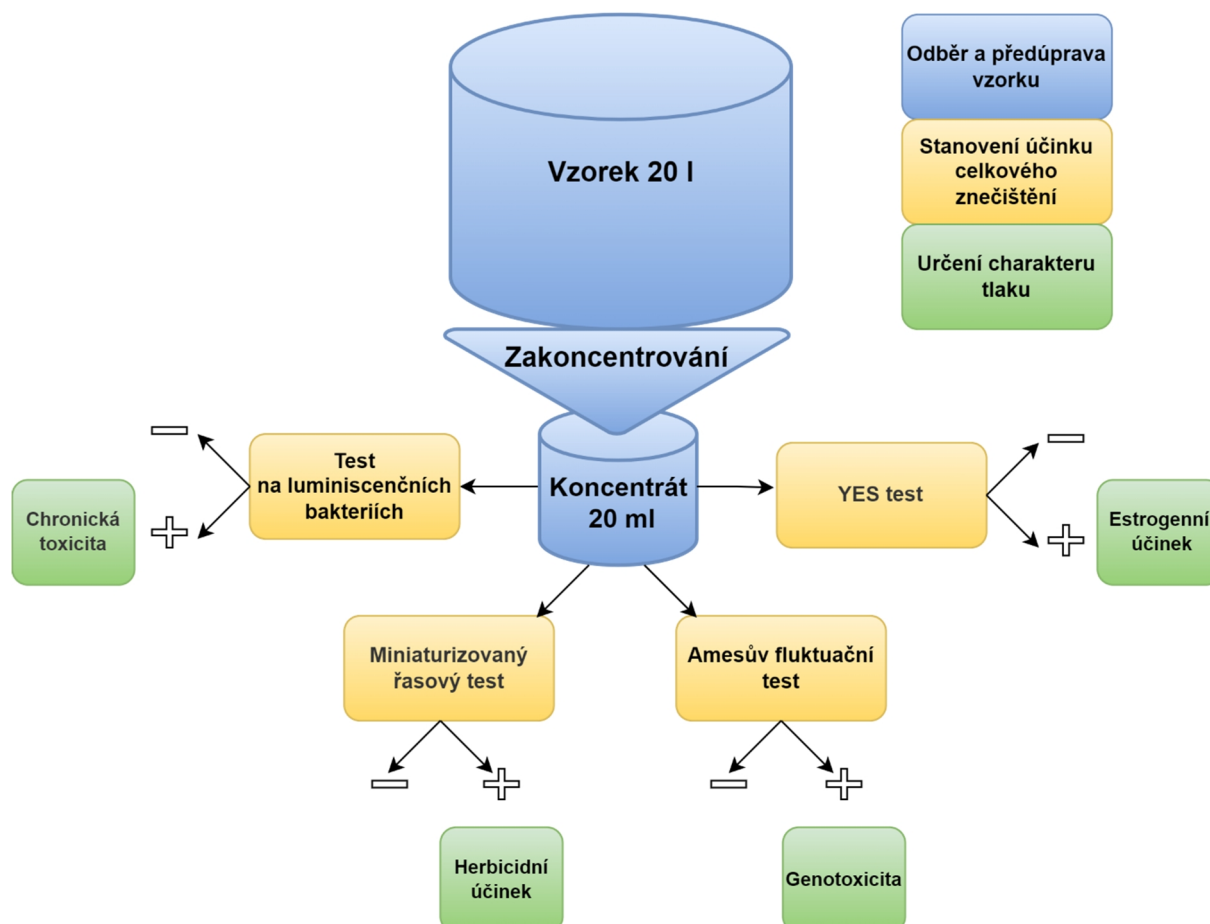
4 Struktura metodiky

Princip identifikace významných antropogenních vlivů, spojených s dlouhodobým znečišťováním vod je znázorněn na schématu níže. Podle něj má metodika následující části, ve kterých jsou popsány postupné kroky provedení celkového stanovení:

Část A VZORKY A JEJICH PŘEDÚPRAVA popisuje způsob odběru vzorků vod, manipulaci s nimi a úpravu jejich vlastností pro potřeby specializovaných stanovení

Část B STANOVENÍ CHRONICKÝCH ÚČINKŮ ZNEČIŠTĚNÍ popisuje provedení specializovaných zkoušek, zaměřených na stanovení vybraných negativních účinků znečištění vod

Část C URČENÍ CHARAKTERU TLAKŮ uvádí návod k využití získaných dat k určení tlaků, které mají vliv na ekologický stav vodních útvarů



Obr. 1: Princip identifikace významných antropogenních vlivů, spojených s dlouhodobým znečišťováním vod

A. ODBĚR VZORKŮ A JEJICH PŘEDÚPRAVA

Protože běžná úroveň znečištění vod obsahuje různé polutanty v relativně nízkých koncentracích, ale jejich výskyt je dlouhodobý, je s touto skutečností spojeno riziko negativního chronického účinku. Při něm se účinky znečištění nemanifestují razantně, negativní působení látek je dlouho skryté. Některé látky se totiž mohou akumulovat v organismu. Bioakumulací dochází k pozvolnému navyšování koncentrace látky v organismu až do hodnoty, vyvolávající detekovatelné negativní účinky. V této fázi je již často poškození organismu nevratné a může mít fatální následky. Existuje tedy reálné riziko nejen pro samotný organismus, ale ohrožen může být i celý ekosystém.

Cíli, kterým je detekce možných dlouhodobých (chronických) účinků znečištění vod, je podřízen jak způsob odběru vzorků vod, tak i jejich předúprava zakoncentrováním tohoto znečištění. Tento proces modeluje bioakumulaci, která je příčinou chronického účinku látek.

A.1 Přístroje a zařízení

Běžné laboratorní vybavení a dále:

- Vybavení pro odběr vzorků vod, odpovídající poměrům na dané lokalitě
- Odměrné válce 50 ml
- Tlakové láhve s dusíkem nebo jiným inertním plynem, s regulačními ventily
- Skleněné náplňové kolony
- Demižony 20 l (15 l)
- Lednice o dostatečném objemu pro uložení odebraných vzorků vod v demižonech do doby jejich zpracování
- Lednice pro uchování extraktů
- Laboratorní tyčová míchadla
- Síto na záchyt rezinů
- Skleněná injekční stříkačka min na 20 ml
- Uzavíratelné vzorkovnice z inertního materiálu pro uchování extraktů / koncentrátů

A.2 Činidla

Používají se výhradně chemikálie zaručené analytické čistoty.

- Sorbenty: XAD4 a XAD16
- Aceton
- Methanol
- Demineralizovaná nebo destilovaná voda

A.3 Odběr vzorků

Odběr vzorků se řídí normami ČSN EN ISO 5667-3 a ČSN EN ISO 5667-6. Protože při předúpravě se 1 000x zahušťuje / koncentruje znečištění vod, s čímž souvisí velké zmenšení původního objemu vzorku, je nutné odebrat dostatečně velké množství vod do vzorkovnice odpovídajícího objemu. Vhodným řešením je odebírat vzorky do náležitě promytých skleněných demižonů.

Hlavní zásady odběru vzorků vod (podrobně viz ČSN EN ISO 5667- 6):

- Vyloučit vliv břehů, tzn. odebírat z mostů, vstoupit do toku nebo připevnit odběrové zařízení na tyč (při odběru ze břehu).
- Odebírat v turbulentních úsecích toku, v proudnici při dostatečné hloubce.
- Vzorkovače, případně nálevky i samotné vzorkovnice je nutno před odběrem opláchnout odebíranou vodou. Lze odebírat i přímo do vzorkovnic, zejména v menších tocích při dostatečné hloubce vody.
- Vzorky odebírat proti směru proudění vody.
- Při nutnosti vícenásobného vstupu do vodního toku v odběrovém místě postupovat při odběru mírně proti proudu.
- Při vzorkování nesmí dojít k odběru vzorkačem zvířeného sedimentu a nárostů na dně toků.

A.4 Manipulace s odebranými vzorky

Po dobu nezbytně nutnou pro transport do laboratoře je žádoucí minimalizovat významným změnám teploty vzorků ve vzorkovnicích. S ohledem na velikost vzorkovnic (demižonů) je doporučeno uspíšit dobu transportu a zamezit vystavení vzorku nadměrnému vlivu světla či zvýšených teplot (podrobně viz ČSN EN ISO 5667-3). Doba transportu a změny teploty vzorku jeho vlivem se zaprotokolují.

Po převozu do laboratoře se vzorky uloží do chladničky, k tomu určené, s teplotou v souladu s ČSN EN ISO 5667-3. Zde jsou uloženy až do dalšího zpracování.

A.5 Předúprava vzorků

Předúprava vzorků je zaměřena na zakoncentrováním / zahuštěním celkového znečištění. Cílem je dosáhnout zakoncentrování 1 000x.

A.5.1 Předčištění sorbentů

Nejprve se připraví směs sorbentů. Do 20 l vzorku vody je potřeba přidat 80 ml směsi sorbentů, připravené v poměru 40 ml XAD4 a 40 ml XAD16, do 15 l demižonu se přidá 60 ml směsi sorbentů (30 ml XAD4 + 30 ml XAD16). Sorbenty se odměří pomocí odměrného válečku. Odměřená množství vsypeme do kádinky.

Aby byl vyloučen vliv případné kontaminace sorbentů na připravovaný koncentrát, provede se jejich předčištění následujícím postupem. Ke směsi sorbentů v kádince se přilije dostatečné množství acetonu tak, aby vrstva kapaliny nad zrny byly přibližně 2 cm až 2,5 cm. Směs se jemně promíchá a nechá se 15 min stát. Poté se aceton opatrně slije a nahradí se stejným množstvím demineralizované nebo destilované vody. Opět se vše promíchá a nechá se v klidu stát 15 minut. Následně se voda slije a provede se stejným způsobem druhé promytí vodou. Poté se přebytečná voda opět opatrně slije.

A.5.2 Příprava koncentráту znečištění

Výše uvedeným způsobem pročištěná směs sorbentů se převede do vzorku vody v demižonu s odebraným vzorkem vody. Před přidáním sorbentů do demižonu je vhodné si do čisté kádinky odlít menší objem vzorku vody, pro případ, že by při převodu část sorbentů ulpěla na stěnách demižonu a bylo by potřeba je spláchnout.

Do demižonu s vzorkem vody a směsí sorbentů se vloží tyčové laboratorní míchadlo a intenzita míchání se nastaví tak, aby všechna zrna sorbentu ve vodě byla mícháním udržena ve vznosu. Vzorek se sorbenty se míchá po dobu 24 h. Po této době se sorbenty přelitím přes síto s patřičnou velikostí otvorů, potřebnou k zachycení všech zrn, oddělí od vody. Těmito sorbenty se pak naplní skleněná kolona. K splachování sorbentů do kolony se použije část vody, zachycená při zcezení sorbentů. Před naplňováním se na dno skleněné kolony nad vypouštěcí ventil umístí malý smotek vaty, aby při jejím vypouštění nedošlo k vyplavování zrn sorbentů.

Po převedení sorbentu do kolony se přebytek vody odpustí tak, aby jí v koloně bylo co nejméně, avšak mezi zrny nesmí dojít ke vzniku vzduchových kapes, všechna zrna musí být propojená vodou. Vypouštění by mělo být ukončeno, když se dolní meniskus vodního sloupce se dotkne horního okraje vrstvy sorbentů v koloně.

Po odpuštění vody se do kolony pro vymytí znečištění, nasorbovaného na reziny, převede 40 ml respektive 30 ml acetonu (podle původního množství odebraného vzorku vody, to je 20 l nebo 15 l). Pro zvýšení účinnosti extrakce se tento objem protlačuje vrstvou sorbentů odspodu nahoru pomocí skleněné injekční stříkačky. Aceton se nechá v koloně působit 15 minut a pak se vypustí do připraveného odměrného válečku o objemu 50 ml. Do něj vyteče acetonový výluh i s malým objemem vody, který zůstal v koloně po jejím naplňování sorbenty.

Poté se z výluhu aceton odstraní odpařováním, akcelerovaným probubláváním sloupce roztoku dusíkem (propanonem). Daným postupem dojde k přechodu všeho vylouženého znečištění do vodného zbytku. Takto získaný koncentrát znečištění se doplní do výsledného objemu 20 ml respektive 15 ml podle původního objemu odebraného vzorku (20 l nebo 15 l) destilovanou vodou. Tímto postupem dosáhneme tisícinásobného zakoncentrování zachyceného znečištění vod. Připravený koncentrát se pak podrobí sadě specializovaných testů, zaměřených na detekci rizika chronických účinků celkového znečištění vod.

A.6 Odkazy na normy

ČSN EN ISO 5667-3 Kvalita vod - Odběr vzorků - Část 3: Konzervace vzorků vod a manipulace s nimi.

ČSN EN ISO 5667- 6 Kvalita vod - Odběr vzorků - Část 6: Návod pro odběr vzorků z řek a potoků.

B. STANOVENÍ CHRONICKÝCH ÚČINKŮ ZNEČIŠTĚNÍ

Sada metod pro stanovení biologických účinků vzorků vod je zaměřena na hlavní negativní dlouhodobé účinky, které mohou způsobovat látky, obsažené v celkovém znečištění vod. Těmi jsou chronická toxicita, herbicidní účinky, genotoxicita a estrogenita, Limitní hodnoty pro stanovení úrovně rizika vycházejí z TNV 75 7769 TNV 75 7769 Jakost vod - Metoda stanovení chronických účinků znečištění povrchových vod.

B.1 Chronická toxicita

B.1.1 Podstata zkoušky

Tato metoda jako zkušební organismus ke stanovení možných negativních účinků vzorků používá luminiscenční bakterie. Vlivem toxických účinků látek, obsažených ve zkoumaném vzorku, dochází ke snížení jejich luminiscence, která je ukazatelem míry toxicity vzorku. Metodika zkoušky vychází ze zásad, specifikovaných normou ČSN EN ISO 11348, a je účelově upravena pro potřeby stanovení účinku koncentráту celkového znečištění vod.

B.1.2 Zkušební organismus

Aliivibrio fischeri – mořská, aerobní, heterotrofní, gram-negativní bakterie, schopná bioluminiscence, která vzniká katalytickými účinky enzymu luciferázy na nízkomolekulární substrát luciferin. Vlivem účinků toxikantů na bakteriální buňku dojde ke snížení emise světla. Ke zkouškám se používají komerčně dodávané bakterie, které jsou dodávány jako inokulum v latentní fázi růstu. Detailní pokyny pro aktivaci inokula specifikuje výrobce v příložených návodech. Protože způsoby přípravy inokula, sušení nebo lyofilizace, mají vliv na citlivost zkušebního organismu. Bakterie lze také získat z České sbírky mikroorganismů Brno (CCM). Pro daný případ jsou níže uvedeny složení nezbytných roztoků.

B.1.3 Přístroje a zařízení

- Mraznička k uchování konzervovaných kultur ($-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Chladnička k uchování aktivované zásobní kultury ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Termoblok s řízenou teplotou k temperování zkoušených vzorků a aktivačních roztoků na $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Luminometr s měřicí celou, temperovanou na $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zkušební zkumavky z chemicky inertního materiálu, vhodné pro zvolený luminometr
- pH metr
- Stopky
- Automatické pipety s nastavitelným objemem
- Konduktometr

B.1.4 Roztoky a činidla

Ředící voda

Protože *Aliivibrio fischeri* jsou bakterie mořského původu, jako ředící voda se používá 2% roztok NaCl. Ten se připraví rozpuštěním 20 g chloridu sodného (NaCl) v 1 l destilované nebo demineralizované vody. Hodnota pH připraveného roztoku se upraví na $7 \pm 0,2$ roztokem hydroxidu sodného (NaOH) v koncentraci 1 mol/l, nebo kyselinu chlorovodíkovou (HCl) v koncentraci 1 mol/l.

Reaktivační roztok

Slouží pro reaktivaci bakterií před testem.

- 8,0 g monohdrátu D(+)-glukózy
- 20,0 g NaCl
- 2,035 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 0,30 g KCl
- 11,9 g HEPES

Složky se rozpustí ve vodě a roztok se míchá 30 min. Hodnota pH připraveného roztoku se upraví na $7 \pm 0,2$ roztokem hydroxidu sodného (NaOH) v koncentraci 1 mol/l, nebo kyselinu chlorovodíkovou (HCl) v koncentraci 1 mol/l

U komerčně prodávaných bakterií je reaktivační roztok zpravidla firmami dodáván zároveň s kulturou.

Referenční látky

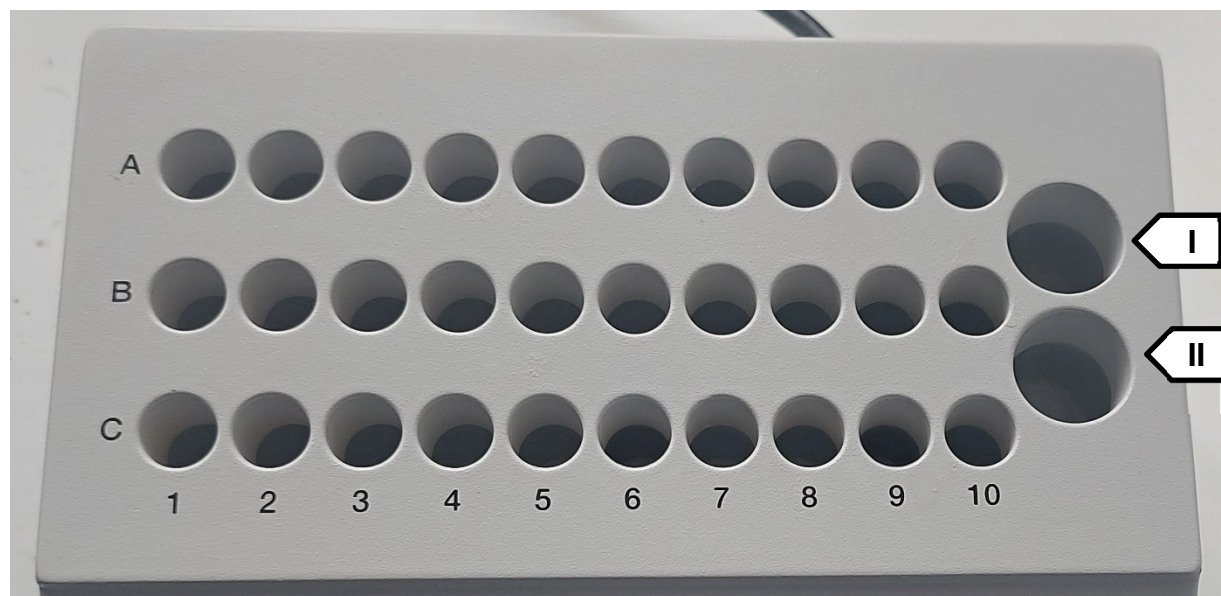
Referenční látky slouží k ověření citlivosti zkušebních organismů. V každé zkoušce musí být nasazena jedna z níže uvedených látek ve stanovené koncentraci.

- Dichroman draselný ($K_2Cr_2O_7$) rozpuštěný v 2% roztoku NaCl v koncentraci 22,6 mg/l
- Síran zinečnatý ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) rozpuštěný v 2% roztoku NaCl v koncentraci 219,8 mg/l

B.1.5 Postup stanovení

Před zahájním zkoušky se do získaného koncentráту přidá $NaCl_2$ v takovém množství, aby jeho výsledná koncentrace byla 2 % (stejně jako ve standardní ředící vodě).

Příprava zkušebních koncentrací, pozitivní a negativní kontroly



Obr. 1B1: Rozmístění šachtic v termobloku

V termobloku (viz obr. 1B1), který udržuje teplotu 15⁰ C, se do šachtice, na obrázku označené **I**, umístí zkumavku s 12 ml reaktivačního roztoku.

Řada **A** slouží k přípravě negativní kontroly (ředící voda), pozitivní kontroly (roztok referenční látky) a zkušebních koncentrací zahuštěného znečištění. Dávkování se provádí podle následujícího schématu:

A1 2 ml ředící vody – **negativní kontrola**

A10 2 ml koncentrátu

A9 1 ml koncentrátu + 1 ml ředící vody PROMÍCHAT

A8 1 ml z **A9** + 1 ml ředící vody PROMÍCHAT

Dále stejným postupem až do **A3**

A2 2 ml referenční látky – **pozitivní kontrola**

Aktivace zkušebních akterií

Bezprostředně před použitím v testu vyjme z mrazničky ampuli se zamraženými luminiscenčními bakteriemi a následně ji po dobu 2 minut rozmrazujeme pozvolným protřepáváním ve vodní lázni (např. v 1 l kádini) ve vodě laboratorní teploty. Poté se do ampule s rozmraženými bakteriemi přidá 0,5 ml reaktivačního roztoku ze zkumavky umístěné v šachtici **I**, promíchá se, uzavře se a nechá se temperovat v šachtici termobloku po dobu 15 min. Po uplynutí této doby se aktivované bakterie přelijí do zkumavky s reaktivačním roztokem, opatrně promíchají převrácením uzavřené zkumavky ve vertikálním směru tak, aby bylo zabráněno tvorbě bublin. Z této bakteriální suspenze se rozdávkuje po 0,5 ml do všech zkumavek/kyvetek, umístěných v šachticích v řadách **B** a **C** termobloku.

Provedení zkoušky

Po adaptaci bakterií v jednotlivých zkušebních zkumakách, která trvala 15 min, zahájíme samotný test postupem uvedeným níže.

V čase 0

Obecně:

- vyjme zkumavku s bakteriální suspenzí ze šachtice termobloku a umístíme ji do měřicí cely luminometru
- změříme počáteční úroveň luminiscence I_0 , kterou zapíšeme do protokolu
- zkumavku vrátíme do termobloku na stejné místo
- k bakteriální suspenzi v této zkumavce okamžitě přidáme 0,5 ml kontroly / referenční látky / zkušební koncentrace ze zkumavky umístěné v odpovídající poloze v řadě **A**.

Konkrétně postupujeme následovně:

- Změříme svítivost ve zkumavce umístěné v šachtici **B1**, zapíšeme a navrátíme zpět – přidáme 0,5 ml zkušebního roztoku z **A1**.

- Změříme svítivost ve zkumavce umístěné v šachtici **C1**, zapíšeme a navrátíme zpět – přidáme 0,5 ml zkušební roztoku z **A1**.

A dále stejně až po zkumavky umístěné v poloze 10.

V čase 30 min:

Opětovné změření luminiscence I_{30} po době expozice 30 min se provede ve všech zkumavkách / kyvetkách od pozice **B2** po pozici po **C10**.

Poznámky:

Protože pro všechny vzorky musí být doba expozice stejná, jednotlivá dávkování a měření je vhodné provádět v 30 s intervalech.

Protože k 0,5 ml bakteriální suspenze přidáváme 0,5 ml zkoumaného roztoku dochází k naředěné původně připravené koncentrace na polovinu, tedy např. pokud máme vzorek s 1 000x zahuštěným znečištěním je výsledná koncentrace měřeného roztoku 500x.

Vyhodnocení zkoušky

Pro zohlednění spontánních změn svítivosti bakterií se ze změřené intenzity luminiscence v negativních kontrolách (B1 a C1) v časech 0 min (I_0) a 30 min (I_{30}) vypočte korekční faktor k_{30} podle rovnice uvedené níže.

$$k_{30} = I_{30}/I_0$$

Z hodnot, naměřených u obou kontrol, se vypočte průměrná hodnota k_{30} . Ta se použije pro výpočet teoretické hodnoty svítivosti při době expozice 30 min (I_{t30}) ve všech zkumavkách / kyvetkách z šachtic **B2** až **C10** termobloku. Této hodnoty by dosáhla svítivost v dané zkumavce po 30 min, kdyby na bakterie, v ní umístěné, působila pouze ředící voda bez jakékoliv testované látky. Rovnice pro výpočet teoretické hodnoty svítivosti I_{t30} je uvedena níže:

$$I_{t30} = I_0 \cdot k_{30}$$

Pro výpočet procenta inhibice svítivosti se pak porovnává naměřená hodnota v čase 30 min s touto teoretickou hodnotou následovně:

$$\text{Inhibice [\%]} = I_{30}/I_{t30} \cdot 100 - 100$$

Následně se pomocí vhodné lineární nebo nelineární regresní analýzy pro každou expozici vypočte závislost účinku na koncentraci, tj. hodnota EC_{50} . V případech, kdy se výsledek testu nevyjadřuje pomocí hodnot EC_{50} , může být výsledek testu vyjádřen u konkrétní koncentrace vzorku v % výsledného účinku.

Poznámka:

V některých případech může být změřená svítivost větší, než svítivost teoretická. Zde se jedná nikoliv o inhibici, ale stimulaci. Na obr. 2B1 je uveden návrh pracovního protokolu k zápisu naměřených dat a výpočtu stupně inhibičního (stimulačního) účinku vzorku.

Číslo vzorku:		Testovací organismus: <i>Photobacterium phosphoreum</i> CCM 3421		Ředění kultury v testu:							
Datum provedení testu:		Druh kultury:		Přístroj: Dr. Lange LUMISox							
Provedl:		Ředící roztok: 2% NaCl		Poznámka:							
Jednotky:											
Kontrola	Koncentrace	Počet hodnot	Nam. hodnota	Průměr	Nam. hodnota	Teor. hodn.	Inhibice [%]	Prům. inhib.	Průměr	Inhibice [%]	Prům. inhib.
B1		10	115	k15 = 115/10	k15	k30 = 130/10			k30		
C1											
Vzorek											
B2							115/115*100-100	[%]		130/130*100-100	[%]
C2											
B3											
C3											
B4											
C4											
B5											
C5											
B6											
C6											
B7											
C7											
B8											
C8											
B9											
C9											
B10											
C10											

Obr. A1: Vzor protokolu pro test na luminiscenčních bakteriích

B.1.6 Posouzení rizika chronické toxicity

K posouzení rizika chronické toxicity znečištění vod se používá hodnota EC_{50} , stanovená při expozici 30 min. Toto riziko lze očekávat ve všech případech kdy 50% inhibici vyvolá koncentrát s úrovní zahuštění znečištění nižší než 125x (viz tab. 1B1).

V tab. 1B1 jsou uvedeny stupně rizika chronických účinků znečištění v závislosti na limitních hodnotách zahuštění znečištění.

Tab. 1B1: Limitní hodnoty zahuštění znečištění pro určení stupně rizika chronických účinků

Zahuštění	Stupeň rizika
500x	II. zanedbatelné riziko
125x	III. maximálně přípustné riziko
63x	IV. zvýšené riziko
1x	V. vážné riziko

B.1.7 Kontrola řízení kvality

Zkouška je platná, jestliže:

- hodnota k_{30} pro 30 min inkubace je v rozsahu 0,6 až 1,8
- paralelní stanovení se neodchyluje od svých průměrů o více než 3%. To platí pro kontroly i pro zkoušené vzorky, z nichž se určuje hodnota EC_{50}
- referenční látky v určených koncentracích způsobují při 30 min expozici inhibici 20% až 80%
- kontrola citlivosti *Aliivibrio fischeri* na standardech se provádí ve čtvrtletních intervalech, kdy se vychází z koncentrace 1 g/l referenční látky a otestuje se celá koncentrační řada (500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l ...). Do této řady se rovněž „vloží“ koncentrace, určená pro ověření citlivosti bakterií v testech.

B.1.8 Odkazy na normy

ČSN EN ISO 11348-1 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Aliivibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi

ČSN EN ISO 11348-2 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Aliivibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi (1.5.2009) (změna A1 (757734) z 1.6.2019)

ČSN EN ISO 11348-3 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Aliivibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi (1.5.2009) (změna A1 (757734) z 1.6.2019)

B.2 Herbicidní účinek

B.2.1 Podstata zkoušky

Metoda, vycházející ČSN EN ISO 8692, je zaměřená na stanovení možných herbicidních účinků testovaných vzorků, které se projevují inhibicí růstu zkušebních organismů, kterými jsou

jednobuněčné zelené řasy. Pro potřeby zkoušky se po dobu expozice, která je 72 h, provádí kultivace jednodruhového řasového kmene *Raphidocelis subcapitata* v definovaném živném médiu, obsahujícím koncentrační řadu zkoušeného vzorku a inokula řasových buněk. Účinek vzorku se vyhodnocuje porovnáním intenzity nárůstu řas v testovaných koncentracích vzorku s kontrolou.

B.2.2 Zkušební organismus

Raphidocelis subcapitata – jednobuněčná planktonní zelená sladkovodní řasa, dříve znám jako *Selenastrum capricornutum* a *Pseudokirchneriella subcapitata*. Uvedené řasové organismy lze získat ve Sbírce autotrofních mikroorganismů CCALA

Řasy se uchovávají na šikmém agaru BBM v ledničce při $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Minimálně dvakrát do roka se musí řasy přeočkovat na čerstvý agar. Dvakrát v měsíci se kontroluje, zda nedošlo k poškození řas.

B.2.3 Přístroje a zařízení

Veškeré zařízení přicházející do styku s testovaným vzorkem, musí být vyrobeno ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu.

- 96-jamkové mikrotitrační destičky – průhledné s plochým dnem a prostorem pro „okap“ po okrajích desky
- Autokláv
- Automatické pipety – pro dávkování různých objemů 2 – 20 μl , 20 – 200 μl , 200 – 1000 μl , 1 – 10 ml
- Elektromagnetické míchadlo
- Klimatizovaný box nebo místnost s kontrolovanou teplotou a světelným zdrojem vhodných vlnových délek
- Kultivační baňky – Erlenmayerovy baňky na 250 ml se zátkami propouštějící vzduch
- Lednice 4 °C
- Multikanálová pipeta
- Pasteurovy pipety
- pH metr
- Pipetovací rezervoár
- Mikroskop
- Cyrusova komůrka
- Mikrodestičkový spektrofotometr, schopný změřit absorbanci $680 \pm 20\text{ nm}$ (volitelný)

B.2.4 Činidla a roztoky

Zásobní roztoky

Pro přípravu zásobních roztoků se používá demineralizovaná nebo destilovaná voda.

BBM médium – pro předkultivaci a uchovávání řas

Zásobní roztok č. 1 - NaNO_3	25 g/l
Zásobní roztok č. 2 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,5 g/l
Zásobní roztok č. 3 - NaCl	2,5 g/l

Zásobní roztok č. 4 - K_2HPO_4 7,5 g/l

Zásobní roztok č. 5 - KH_2PO_4 17,5 g/l

Zásobní roztok č. 6 - $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 2,5 g/l

Zásobní roztok č. 7 – H_3BO_3 11,4 g/l

Zásobní roztok č. 8

EDTA 50 g/l

KOH 31 g/l

Navážky obou chemikálií se současně rozpustí v demineralizovaná nebo destilované vodě a roztok se doplní do 1 litru.

Zásobní roztok č. 9

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 4.98 g

koncentrovaná H_2SO_4 1.0 ml

Obě chemikálie se současně rozpustí v demineralizovaná nebo destilované vodě a roztok se doplní do 1 litru.

Zásobní roztok č. 10

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8,82 g

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,44 g

MoO_3 0,71 g

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1,57 g

$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 0,49 g

Navážky se současně rozpustí v demineralizovaná nebo destilované vodě a roztok se doplní do 1 litru.

BBM růstové médium se ze zásobních roztoků připraví následovně:

Do 900 ml demineralizované nebo destilované vody se přidá po 10 ml zásobních roztoků č. 1 až 6, zásobní roztoky č. 7 až 10 se přidají v objemu 1 ml a vše se doplní do 1 l. Výsledný roztok se sterilizuje autoklávováním (120°C, 15 min). Konečné pH roztoku by mělo mít hodnotu 6,6.

ISO roztok - pro přípravu zkušebních koncentrací vzorku:

Zásobní roztok č. 1 – živiny

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,2 g

NH_4Cl 1,5 g

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,8 g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,5 g

KH_2PO_4 0,16 g

Navážky všech chemikálií se rozpustí v demineralizovaná nebo destilované vodě a roztok se doplní do 1 litru.

Zásobní roztok č. 2 – Fe-EDTA

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 80 mg

$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 100 mg

Navážky obou chemikálií se rozpustí v demineralizovaná nebo destilované vodě a roztok se doplní do 1 litru.

Zásobní roztok č. 3 – stopové prvky

H_3BO_3 185 mg

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 415 mg

$ZnCl_2$ 3 mg

CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg

Navážky všech chemikálií se rozpustí v demineralizovaná nebo destilované vodě a roztok se doplní do 1 litru.

Zásobní roztok č. 4 – NaHCO₃ 50 g/l

Zásobní roztoky č. 1 až 3 se sterilizují membránovou filtrací (průměr póru 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min). Zásobní roztok č. 4 se sterilizuje pouze membránovou filtrací. Připravené roztoky se skladují ve tmě, v teplotě 4°C ± 2°C.

Výsledný ISO roztok se připraví přidáním příslušného objemu zásobních roztoků živin následovně:

K demineralizované vodě v 1 l baňce se přidá 10 ml zásobního roztoku č. 1 a po 1 ml zásobního roztoku č. 2, 3 a 4. Vše se doplní demineralizovanou vodou do výsledného objemu 1 l.

Hodnota pH ISO roztoku by měla být 8,1 ± 0,2.

Referenční látky

Referenční látky slouží k ověření citlivosti zkušebních organismů.

- dichroman draselný (K₂Cr₂O₇)
- 3,5-dichlorfenol

B.2.5 Postup zkoušky

Příprava předkultivace a inokula

Tři dny před začátkem zkoušky (v pátek) se připraví předkultivace (suspenze sloužící k udržení exponenciálního růstu řasy do začátku zkoušky). Pro předkultivaci se používá BBM růstové médium.

Do Erlenmayerovy baňky obsahující 100 ml růstového média se inokulují dostatečným množstvím buněk řas *Raphidocelis subcapitata*, uchovávaných na šikmém agaru. Řasy se inkubují při 23 °C ± 2 °C 72 h, při stálém osvětlení. Takto připravená předkultivace se použije jako inokulum pro samotnou zkoušku.

Bezprostředně před nasazením zkoušky se pomocí mikroskopu a za použití Cyrusovy komůrky stanoví počet řasových buněk, narostlých v předkultivaci, aby bylo možno vypočítat potřebný objem inokula, který má být použit. V kontrole a jednotlivých zkušebních koncentracích by mělo být dosaženo počáteční hustoty 50 000 ± 2 000 buněk/ml.

Počítání řas v Cyrusově komůrce

Počítají se řasy ve 40 řadách komůrky a výsledná hodnota se vynásobí číslem 100. Tím se získá počet buněk v 1 ml řasové suspenze. V komůrce by mělo být spočteno minimálně 300 řas.

Poznámka: Při odečtu po 72 hodinách, kdy dojde k velkému nárůstu řas, stačí spočítat např. jen 10 řad, vynásobit 4 (tzn. dopočítat do 40 řad) * 100 = opět se získá počet řas v 1 ml.

Výpočet potřebného objemu inokula

$$x = b/a \cdot V$$

x	potřebný objem inokula
a	hustota inokulační řasové kultury v 1 ml
b	požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu v 1 ml = 50 000 buněk
V	objem testovaného roztoku v ml

Příprava zkoušených a kontrolních testovaných sad

- **Koncentrační řada vzorku** se připraví smícháním vhodných objemů zkoušených vzorků (nebo zásobních roztoků zkoušené látky), ISO živného roztoku a řasového inokula do 8 jamek v 96-jamkové mikrotitrační destičce v objemu 250 µl/jamka na zkoušenou koncentraci.
- **Kontrola** obsahuje ISO živné médium a inokulum bez zkoušeného vzorku ve stejném objemu jako koncentrační řada vzorku, tedy 250 µl/jamka. Kontrolní vzorky by měly být na mikrotitrační destičce rovnoměrně rozmístěny v minimálním počtu tří opakování.
- **Slepý vzorek** obsahuje ISO živné médium bez inokula řas. V případě silně zbarvených vzorků lze připravit i slepý vzorek obsahující ISO médium a vzorek ve vhodné koncentraci. Každá varianta slepého vzorku se na destičku dávkuje do tří jamek v objemu 250 µl/jamka.

Inkubace testu

Do 96-jamkové mikrotitrační destičky se do prostoru po krajích nadávkuje demineralizovaná nebo destilovaná voda do výškové úrovně objemu vzorku v jamkách, aby se omezilo nerovnoměrné vypařování vody z jamek. Destička se následně zavře průhledným víčkem a obalí strečovou fólií. Tímto je zabráněno vzdušné kontaminaci a sníženo odpařování vody. Destičky se inkubují při 23 °C ± 2 °C při kontinuálním bílém světle.

Odečet zkoušky

Při odečtu po 72 h je nutné všechny jamky řádně propipetovat pomocí multikanálové pipety, aby se buňky řas rovnoměrně rozsuspendovaly. Je vhodné mezi jednotlivými vzorky a kontrolami měnit špičky, aby nedošlo ke křížové kontaminaci a zkreslení výsledků měření.

Mikroskopický odečet

V čase 0 h a 72 h se v Cyrusově komůrce spočítají řasové buňky.

Přístrojový odečet

V každé jamce se změří hustota buněk, spektrofotometricky vyjádřená jako absorbance při vlnové délce 680 nm.

Poznámka:

U silně zbarvených vzorků může docházet ke zkreslení výsledků měření absorbance, proto je vhodnější stanovit hustotu buněk počítáním buněk v Cyrusově komůrce.

Vyhodnocení výsledků

Z paralelních opakování kontroly a testovaných koncentrací vzorku se vypočte průměrná hodnota. Pro výpočet procenta vlivu vzorku (inhibice / stimulace) se použije porovnání

průměrných hodnot nárůstu v jednotlivých koncentracích na konci doby expozice vztažených k průměrné hodnotě nárůstu v kontrole.

Z vypočtených hodnot se stanoví koncentrace EC_{50} za použití vhodného statistického nástroje (software).

B.2.6 Posouzení rizika herbicidních účinků

K posouzení rizika herbicidních účinků znečištění vod se používá hodnota EC_{50} stanovená v testech. Toto riziko lze očekávat ve všech případech kdy 50% inhibici růstu řasové kultury vyvolá koncentrát s úrovní zahuštění znečištění nižší než 125x (viz tab. 1B2).

V tab. 1B2 jsou uvedeny stupně rizika herbicidních účinků znečištění v závislosti na limitních hodnotách zahuštění znečištění.

Tab. 1B2: Limitní hodnoty zahuštění znečištění pro určení stupně rizika chronických účinků

Zahuštění	Stupeň rizika
500x	II. zanedbatelné riziko
125x	III. maximálně přípustné riziko
63x	IV. zvýšené riziko
1x	V. vážné riziko

B.2.7 Kontrola řízení kvality

V kontrole musí být během doby expozice dosaženo minimálně 67 násobného zvětšení řasové populace.

Pro ověření citlivosti zkušebních řas se v tříměsíčních intervalech provádí zkouška s referenční látkou ($K_2Cr_2O_7$, 3,5-dichlorfenol). Hodnota EC_{50} růstové rychlosti se po 72 h musí pohybovat v rozmezí hodnot 0,92 – 1,46 mg/l pro dichroman draselný a 2,08 – 4,68 mg/l pro 3,5-dichlorfenol.

B.2.8 Dlouhodobé uchování řas

Sbírkový řasový kmen *Raphidocelis subcapitata* se jako zásobní kultura udržuje na BBM šikmém agaru.

BBM šikmý agar se připraví následovně:

Ke 100 ml BBM růstového média se přidají 2 g čistého agaru. BBM agar se autoklávuje 15 min při 121°C. Uvařený agar se vylije do větších zkumavek a nechá ztuhnout v šikmé poloze.

Na šikmý agar se přeočkují řasy a inkubují se při 23 °C ± 2 °C 72 h, při stálém osvětlení. Poté se zkumavky skladují v ledničce při 4°C. Minimálně dvakrát do roka je nutné řasy přeočkovat na čerstvý BBM agar.

B.2.9 Odkazy na normy

ČSN EN ISO 8692 Kvalita vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas

B.3 Genotoxicita

B.3.1 Podstata zkoušky

Touto metodou se stanovuje genotoxický potenciál vzorků vod pomocí bakterií. Jde o fluktuální metodu, kde kombinací dvou serotypů geneticky upraveného bakteriálního kmene je umožněno stanovit genotoxicitu chemických látek, projevující se indukucí bodové mutace (substituce bází a posunové mutace) v genech kódující enzymy, které se účastní biosyntézy aminokyseliny histidinu. Tato mutace umožní bakteriím, které původně nejsou schopny růst v médiu bez přídavku histidinu růst, vlastní tvorbu histidinu a tedy i růst v histidinu prostém médiu. S růstem spojený metabolismus je příčinou změny pH růstového média, kterou indukuje změna jeho zabarvení, pro kterou je do média přidáván také chromogen.

B.3.2 Princip zkoušky

Geneticky upravený bakteriální kmen je po dobu 100 minut při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ v 24 jamkové mikrotitrační destičce vystaven působení různých koncentrací zkoumaného vzorku. Díky této expozici genotoxické agens, přítomné v testovaném vzorku, může indukovat mutaci v jednom nebo obou markrech genu bakteriálních kmenů (hisG46 u TA 100 a hisD3052 u TA 98) v korelaci s testovanou koncentrací. Indukce mutací způsobí v závislosti na koncentraci zvýšení počtu mutantních kolonií. Míru mutagenní aktivity testovaného vzorku ukazuje počet jamek se změnou barvy chromogenu z fialové na žlutou.

B.3.3 Zkušební organismus

Geneticky upravený bakteriální kmen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotyp Typhimurium TA 98 a TA 100 (nutno uchovávat v ultrakryostatu při -70°C).

B.3.4 Přístroje a zařízení

- Inkubátor s nastavitelnou teplotou a časem
- pH metr
- Autokláv
- Sušárna
- Magnetická míchačka
- Třepačka
- Mraznička (-20°C)
- Pipety – 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml (skleněné, automaticky nastavitelné)
- Nastavitelná 8-kanálová pipeta
- Lahve 250 ml, 500 ml, 1 000 ml
- Odměrný válec 100 ml a 200 ml
- Odměrné baňky 20 ml, 200 ml a 500 ml
- Sterilní stříkačkové filtry (0,2 μm a 0,45 μm)
- Ehrlenmeyerova baňka 50 ml
- Inokulační klička
- Mikrodestičkový spektrofotometr (volitelný)
- Transparentní sterilní PS 24-jamkové a 384 jamkové destičky a F dnem a víčkem
- Kryogenní zkumavky
- Ultrakryostat (-70°C)

B.3.5 Roztoky a média

K provedení lze využít komerčně dodávané testovací sety, lze však také použít pouze bakteriální kmeny, získané z České sbírky mikroorganismů mikroorganismů Brno (CCM), a komerčně dodávané S9 frakce jaterních enzymů (pro stanovení vlivu metabolické aktivace). Pro druhý případ jsou níže uvedeny návody na přípravu potřebných roztoků a médií.

Fosfátový pufr

- Pufr NaH_2PO_4 0,2 mol/l

14,39 g NaH_2PO_4 (nebo 16,55 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) se rozpustí v 600 ml demineralizované nebo destilované vody

- Pufr Na_2HPO_4 0,2 mol/l

28,39 g Na_2HPO_4 se rozpustí v 1 l demineralizované nebo destilované vody

Pufr NaH_2PO_4 0,2 mol/l se přidává do pufru Na_2HPO_4 0,2 mol/l až je dosaženo hodnoty pH 7,4. Připravený roztok se autoklávuje.

Fosfátový pufr se uchovává při pokojové teplotě, ve tmě. Roztok je stálý nejméně 1 rok.

Roztok D-biotinu

12,2 mg D-biotinu se rozpustí ve 100 ml destilované vody, za stálého zahřívání.

Po zchlazení se roztok sterilizuje filtrací (0,2 μm sterilní filtr). Roztok se skladuje při -20°C , v objemech 10 ml a 0,5 ml ve sterilních kryogenních zkumavkách. Takto uchovávané roztoky jsou stálé 1 rok.

Roztok L-histidinu

50 mg L-histidinu se rozpustí v 50 ml demineralizované nebo destilované vody,

Roztok se sterilizuje filtrací (0,2 μm sterilní filtr). Skladuje se při -20°C , v objemech 1,5 ml a 0,3 ml, ve sterilních kryogenních zkumavkách. Takto uchovávané roztoky jsou stálé 1 rok.

Glokoza-6-fosfát roztok

0,68 g D-glokozy-6-fosfátu se rozpustí v 10 ml demineralizované nebo destilované vody.

Roztok se sterilizuje filtrací (0,2 μm sterilní filtr). Roztok se skladuje při -20°C , v objemech 0,2 ml, ve sterilních kryogenních zkumavkách. Takto uchovávané roztoky jsou stálé 1 rok.

NADP roztok 0,04 mol/l

Vhodné množství NADP se rozpustí v 10 ml demineralizované nebo destilované vody, aby bylo dosaženo finální koncentrace 0,04 mol/l. Pro různě hydratované formy NADP se vypočítá potřebné množství podle molekulární hmotnosti uváděné v produktových listech. Rovnice pro výpočet je následující:

$$m = c \cdot MW \cdot V$$

m – navážka

c – žádaná molární koncentrace

MW – molekulární hmotnost

V – požadovaný objem roztoku

Roztok se sterilizuje filtrací (0,2 µm sterilní filtr) a skladuje při – 20°C, v objemech 0,7 ml, ve sterilních kryogenních zkumavkách. Takto uchovávané roztoky jsou stálé 1 rok.

KCl roztok

74,56 g KCl se rozpustí v 1 l destilované vody

Roztok se autoklávuje, uchovává se při pokojové teplotě, v temnu. Roztok je stálý po dobu 1 roku.

MgCl₂.6H₂O roztok

50,83 g MgCl₂.6H₂O se rozpustí v 1 l demineralizované nebo destilované vody

Roztok se autoklávuje, uchovává se při pokojové teplotě, v temnu. Roztok je stálý po dobu 1 roku.

Bromkresolový purpur roztok

51 mg bromkresolového purpuru sodné soli se rozpustí v 30 ml demineralizované nebo destilované vody.

Roztok se připravuje čerstvě před jeho přidáním do připravovaného reverzního indikátorového média.

Ampicilinový roztok

500 mg ampicilinu se rozpustí v 10 ml demineralizované nebo destilované vody

Roztok se sterilizuje filtrací (0,2 µm sterilní filtr) a se skladuje při – 20°C, v objemech 80 µl, ve sterilních kryogenních zkumavkách. Takto uchovávané roztoky jsou stálé 6 měsíců.

Růstové médium

4,7 g živného bujónu

0,31 g NaCl

Obě složky současně se rozpustí v 250 ml demineralizované nebo destilované vody, pH se upraví na 7,5 ± 0,1. Roztok se autoklávuje.

Poznámka:

Živný bujon musí být složen z 40% masového extraktu, z 40% peptonu a 20% NaCl. Jiný poměr živin v komerčně dodávaných živných bujónech negativně ovlivňuje růst salmonel. Finální koncentrace v růstovém médiu by měly obsahovat:

7,5 g/ masového extraktu, 7,5 g/l peptonu a 5,0 g NaCl

Expoziční médium

Médium pro inkubaci bakterií/salmonel se vzorkem obsahující malé množství L-histidinu, který ze začátku testu podpoří několik buněčných dělení salmonel.

Postupně se rozpustí následující látky v 400 ml demineralizované nebo destilované vody:

- 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1,0 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- 5,0 g K_2HPO_4
- 1,75 g $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 2,0 g D-glukóza

Doplní se do objemu 500 ml, pH se upraví na $7,0 \pm 0,2$. Roztok se sterilizuje filtrací (0,2 μm sterilní filtr). Médium se uchovává při 2°C až 8°C. Médium je stále nejméně po dobu 2 měsíců.

Před zahájením zkoušky:

Do 100 ml expozičního média se za sterilních podmínek přidá 0,6 ml roztoku D-biotinu a 0,1 ml roztoku L-histidinu. Médium je stále jen po dobu 14 dní, uchovává se při 2°C až 8°C. Vždy se připraví jen potřebné množství pro dané testy.

Koncentrované expoziční médium

Postupně se rozpustí následující látky v 70 ml demineralizované nebo destilované vody:

- 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 2,0 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- 10,0 g K_2HPO_4
- 3,5 g $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 4,0 g D-glukóza

Doplní se do objemu 93 ml, pH se upraví na $7,0 \pm 0,2$. Roztok se sterilizuje filtrací (0,2 μm sterilní filtr). Médium se uchovává při 2°C až 8°C. Médium je stále nejméně po dobu 2 měsíců.

Do 93 ml koncentrovaného expozičního média se za sterilních podmínek přidá:

- 6 ml roztoku D-biotinu
- 1 ml roztoku L-histidinu

Médium je stále jen po dobu 14 dní, proto se připraví vždy jen potřebné množství. Uchovává se při 2°C až 8°C.

Reverzní indikátorové médium

Připraví se pH indikátorové médium bez L-histidinu.

Roztok I.

Uvedené látky se rozpustí v 500 ml demineralizované nebo destilované vody v uvedeném pořadí:

- 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 2,0 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$

- 10,0 g K_2HPO_4
- 3,5 g $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$

Do roztoku se přidá 15 ml bromkresolového purpuru. Upraví se pH na $7,3 \pm 0,1$. Roztok se autoklávuje.

Roztok II

4,0 g D-glukózy se rozpustí ve 400 ml demineralizované nebo destilované vodě a, pH se upraví na $7,3 \pm 0,1$. Roztok se autoklávuje.

Po zchlazení na pokojovou teplotu se za sterilních podmínek smíchá *roztok I* s *roztokem II* a přidá se 10 ml D-biotinu, tím se získá výsledných 915 ml reversního média, které se uchovává při pokojové teplotě ve tmě. Médium je stále nejméně po dobu 1 měsíce.

Kontrolní roztoky / standardy

Negativní kontrola

Pro přípravu negativních kontrol se vždy používá stejné rozpouštědlo jako pro testované vzorky. V případě tetsování koncentrátů celkového znečištění je jím voda.

Pozitivní kontroly

Všeobecné pravidlo:

10 mg standardu, určeného pro pozitivní kontrolu se rozpustí v 10 ml DMSO.

Vhodné množství tohoto zásobního roztoku pro test (ZR), například po 50 μ l až 80 μ l, pro test se uchovává ve sterilních kryogenních zkumavkách se při -20°C .

Přehled ředění zásobních roztoků standardů:

- TA 98 bez S9: 4-NOPD (4-nitro-o-phenylenediamine) Do testu ZR naředit 1:2 v DMSO
- TA 98 s S9: 2-AA (2-aminoathracene) Do testu ZR naředit 1:200 v DMSO
- TA 100 bez S9: NF (nitrofurantoin) Do testu ZR naředit 1:80 v DMSO
- TA 100 s S9: 2-AA (2-aminoathracene) Do testu ZR naředit 1:50 v DMSO

S9 mix

S9 je komerčně dodávaná frakce z jaterních enzymů krys (Sigma Aldrich, Essence Line) - nutno uchovávat v ultrakryostatu při -70°C .

S9 mix se se připravuje v den zkoušky. Udrhuje se permanentně na ledu a musí být využit do 1 hodiny od přípravy, poté dochází k degradaci enzymů.

- 66 μ l roztoku KCl
- 64 μ l roztoku $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$
- 50 μ l roztoku D-glukóza-6-fosfát
- 200 μ l roztoku NADP
- 1 000 μ l fosfátového pufru
- 20 μ l sterilní demineralizované nebo destilované vody
- 600 μ l S9 frakce

Toto množství S9 mixu je dostatečné pro 2 expoziční misky (to znamená pro 2x 24-jamkové destičky). Pokud je potřeba mixu více, proporcionálně se zvýší jeho množství při přípravě.

B.3.6 Postup zkoušky

Příprava noční kultury

Do erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml (nebo jiné vhodné kultivační nádoby) se za sterilních podmínek napipetuje 20 ml růstového média a 20 µl ampicilinového roztoku. Do růstového média se přidá 20 µl příslušného kmene (TA 98 nebo TA 100) okamžitě po jeho rozmražení. Erlenmeyerovy baňka se překryje alobalem.

V inkubátoru se nastaví časovač a teplota na $19^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$, při této teplotě je kultura udržována do doby, kdy dojde k začátku inkubace bakterií. Kultura se inkubuje při 37°C 10 hodin, frekvence třepání 150 r/min

Příprava testovacího kmene

U noční kultury se změří buněčná (optická) hustota při 595 nm. Hustota kultury v testu kmene TA 98 by měla dosáhnout hodnot 180 FAU a u kmene TA 100 hodnoty 45 FAU. V samotném testu dochází k desetinasobnému naředění testovacího kmene, proto je potřeba, aby na začátku testu bylo dosaženo hodnot 1 800 FAU pro TA 98 a 450 FAU pro TA 100. V případech, kdy není dosaženo požadované buněčné hustoty, prodlouží se doba kultivace o 2 hodiny (na 12 hodin). Jestliže ani po prodloužení oby kultivace nedojde k dosažení požadované hustoty, nemůže být kultura pro test použita.

Pokud má noční kultura větší buněčnou hustotu, provede se pro zkoušku ředění následně:

Ve zkumavce se k 100 µl naředěné noční kultury kmene TA 98 nebo TA 100 přidá 900 µl růstového média (noční kultura se tak 10x naředí). Obsah zkumavky se pečlivě promíchá a změří se optická hustota.

Z hodnot FAU se podle vzorců 1 a 2 vypočítá ředící faktor pro oba kmeny. Hodnota ředícího faktoru se používá pro výpočet objemu expozičního média (vzorec 3), které se přidá k noční kultuře, aby bylo dosaženo vhodného naředění kmenů TA 98 a TA 100 pro test.

Vzorec 1 - ředící faktor pro kmen TA 98

$$d = \frac{X_{595\text{nm}} (\text{FAU})}{180}$$

$X_{595\text{nm}}$ (FAU) je hodnota FAU 10x naředěné noční kultury kmene TA 98

Vzorec 2 - ředící faktor pro kmen TA 100

$$d = \frac{X_{595\text{nm}} (\text{FAU})}{45}$$

$X_{595\text{nm}}$ (FAU) je hodnota FAU 10x naředěné noční kultury kmene TA 100

Z uvedených vzorců výpočtu plyne, že pokud má ředící faktor hodnotu 1, má kultura hustotu, potřebnou pro provedení testu. Pokud je hodnota nižší než jedna, noční kultura požadovanou hodnotu nedosáhla a nelze ji ke zkoušce použít. Pokud je hodnota **d** větší než jedna, provede se dodatečné naředění noční kultury přidáním dodatečného množství expozičního média, jehož množství se vypočte podle vzorce 3.

Vzorec 3 – výpočet naředění noční kultury

$$V_{\text{add}} = (V_{\text{kultury}} \cdot d) - V_{\text{kultury}}$$

V_{add} objem expozičního média, které má být přidáno k noční kultuře, v ml

V_{kultury} objem noční, neředěné kultury v ml

d ředící faktor vypočtený podle vzorců 1 nebo 2

Příklad výpočtu V_{add} pro kmen TA 98:

FAU 10x naředěné noční kultury je 240, podle vzorce 1 je $d = 1,33$, objem noční naředěné kultury je 20 ml.

$$V_{\text{add}} = (20 \cdot 1,33) - 20 = 6,6 \text{ ml}$$

Do neředěné noční kultury se přidá 6,6 ml expozičního média, aby byl kmen TA 98 naředěn na hodnoty 1 800 FAU. Celkový objem naředěné kultury kmene bude 26,6 ml.

24-jamková destička - příprava testovací kultury

Pro přípravu testovací kultury se použije sterilní 24-jamková destička (viz obr. 1B1). Testovací kultura i ředění vzorku se připravují za sterilních podmínek. Doporučuje se za sterilních podmínek připravit vždy dva replikáty šesti zkušebních koncentrací vzorku v následujícím rozsahu: 500 – 250 – 125 - 62,5 - 31,25 – 15,625. Úvodní koncentrace tedy 500 ml/l se dosáhne přidáním 500 ml tisíckrát zahuštěného koncentrátu znečištění k ostatním složkám testovacího roztoku, které také tvoří objem 500 ml. Následnou poloviční koncentraci pro test lze připravit stejným postupem, jako v případě zkoušky s luminiscenčními bakteriemi (viz část B.1), tedy přidáváním stejného objemu sterilní demineralizované či destilované vody ke koncentrátu, a dále stejně ke koncentraci, připravené v předchozím kroku. Výsledné objemy jednotlivých složek pro dosažení daných koncentrací jsou uvedeny v tab. 1B3 a 2B3.



Obr. 1B3: Navržené rozmístění kontrol (negativní – C-, pozitivní – C+) a testovaných koncentrací vzorku D

Po rozpipetování se 24-jamková destička inkubuje při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pro dobu 100 min při intenzitě třepání 150 r/min.

(Viz také volitelné stanovení cytotoxicity)

Tab. 1B3: Příprava testovací kultury bez S a 9 mixu

Složka	Negativní kontrola	Ředění vzorku D	Pozitivní kontrola
	μl		
Koncentrované expoziční médium	100	100	100
Sterilní demineraliz. či dest. voda	800	300	780
Testovaná koncentrace vzorku	0	500	20 standardu*
Naředěná noční kultrura	100	100	100
Celkový objem	1 000	1 000	1 000

* Roztoky standardů, připravené postupem, uvedeným výše - TA 98 4 NOPD, TA 100 – NF

Tab. 2B3: Příprava testovací kultury s S9 mixem

Složka	Negativní kontrola	Ředění vzorku D	Pozitivní kontrola
	μl		
Koncentrované expoziční médium	100	100	100
Sterilní demineraliz. či dest. voda	800	300	780
Testovaná koncentrace vzorku	0	500	20 standardu*
Naředěná noční kultrura	100	100	100
S9	34	34	34
Celkový objem	1 034	1 034	1 034

* Roztoky standardů, připravené postupem, uvedeným výše - TA 98 a TA 100: 2-AA

384-jamková destička – inkubace testovaných koncentrací

Po 100 min se přepipetuje 500 μl testovací kultury z jednotlivých jamek 24-jamkové destičky do pipetovacího rezervoáru (viz obr. 2B3). Do naplněných jamek rezervoáru se přidá 2,5 ml reverzního indikátorového média. Multikanálovou pipetou se obsah vaničky pečlivě promíchá.



Obr. 2B3: Pipetovací rezervoár

Následně se přenese pomocí multikanálové pipety 50 μ l z každé jamky pipetovacího rezervoáru do 48 jamek 384-jamkové destičky. K přepipetování se použije u 8-kanálové pipeta se šesti nasazenými špičkami a pipetuje se ob jednu řadu jamek.

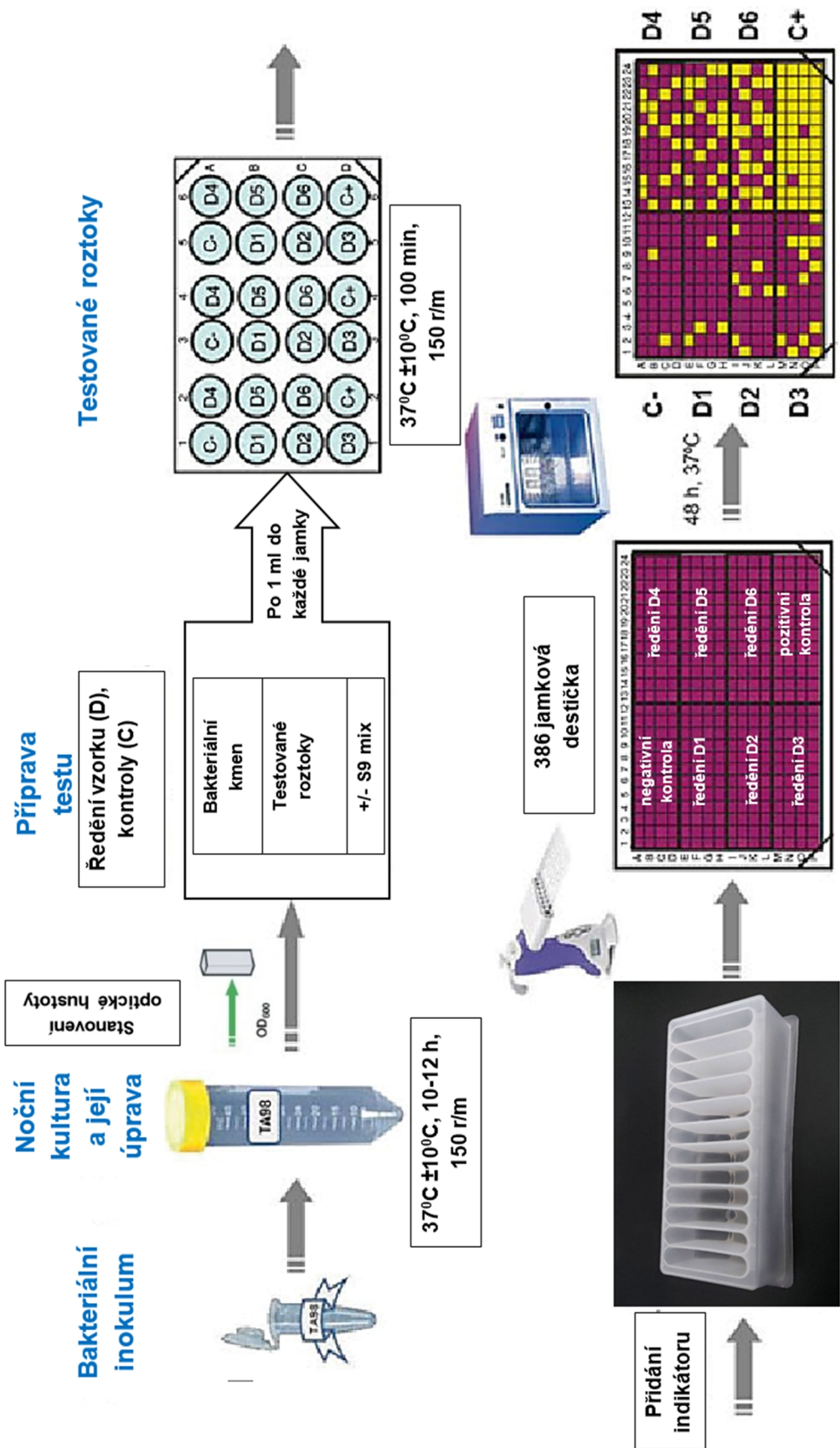
384-jamková destička se inkubuje čá hodiny bez třepání ve tmě při teplotě $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Aby bylo zabráněno vypařování roztoků z jamek destičky, napipetuje se do „okapu“ destičky sterilní destilovaná voda. Destička se zabalí do potravinářské folie.

Po uplynutí doby expozice se spočítají se pozitivní (žluté) a negativní (fialové) jamky v každém 48-jamkovém sektoru 384-jamkové destičky. Množství revertant se spočte vizuálně nebo se použije fotometr ($420 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$). Volitelné použití fotometru je vhodnější, protože v některých případech je obtížné rozlišit pozitivní a negativní jamku.

Zkoušený vzorek je považován za mutagenní, pokud dojde alespoň u jednoho kmene ve variantě testu s nebo bez přídavku S9 mixu k významnému zvýšení počtu revertantních jamek v porovnání s negativní kontrolou ve 48-jamkovém sektoru testovaného zahuštění vzorku 125x a nižším.

Pokud po 48 hodin není dosaženo v pozitivní kontrole dostatečné množství žlutých jamek, které indikují růst revertant (≥ 25), prodlouží se doba inkubace o dalších 24 hodin za stejných podmínek.

Schematicky je provedení testu genotoxicity uvedeno na obr. 3B3.



Obr. 3B3: Schéma provedení Amesova fluktučního testu

B.3.7 Posouzení rizika mutagenních účinků

K posouzení rizika mutagenních účinků znečištění vod se používá úroveň zahuštění znečištění, která v provedených testech vykazuje statisticky významné zvýšení výskytu mutací. Indikující je výše úrovně zahuštění nižší než 125x (viz tab. 3B3).

V tab. 1B1 jsou uvedeny stupně rizika herbicidních účinků znečištění v závislosti na limitních hodnotách zahuštění znečištění.

Tab. 3B3: Limitní hodnoty zahuštění znečištění pro určení stupně rizika chronických účinků

Zahuštění	Stupeň rizika
500x	II. zanedbatelné riziko
125x	III. maximálně přípustné riziko
63x	IV. zvýšené riziko
1x	V. vážné riziko

B.3.8 Kontrola řízení kvality

Test je validní pokud:

- Průměr negativní kontroly je ≥ 0 a ≤ 10 jamek s revertantním růstem na 48 jamkovou oblast destičky, za všech testovacích podmínek ($\pm S9$ mix, testovací kmen TA 98 a TA 100).
- Průměr pozitivní kontroly ≥ 25 jamek s revertantním růstem na 48 jamkovou oblast destičky, za všech testovacích podmínek ($\pm S9$ mix, testovací kmen TA 98 a TA 100).

Pokud jedno nebo obě kritéria nejsou dosažena, část testů (např. jedna varianta testu – TA 98 S9+) nebo celý test je neplatný.

B.3.9 Stanovení cytotoxicity (volitelné)

Cytotoxicita, tedy účinek látky, který způsobí úhyn bakterií testovacího kmene, může být příčinou falešně negativního stanovení stanovení genotoxicity. Je totiž logické, že u mrtvých bakterií nemůže dojít k mutaci a tedy nedojde ke změně zabarvení reverzního indikátorového média, které je indikuje. Proto se stanovení tohoto účinku testované látky doporučuje.

Pro stanovení možných cytotoxických účinků se v každé z testovaných koncentrací a negativní kontrole fotometricky změří buněčná hustota testovacího kmene $X_{595\text{ nm}}$ v čase t_0 , tedy na počátku a po 100 minutách kultivace (čas t_{100}). Doporučuje se měřit cytotoxicitu jen u kmene TA 98, protože buněčná hustota u kmene TA 100 zůstává v této fázi nízká. Cytotoxicita C , vyjádřená v % se vypočte podle níže uvedeného vzorce.

$$C = 100 - 100 \left(\frac{X_{S100} - X_{S0}}{X_{NC100} - X_{NC0}} \right)$$

X_{S0} je hodnota $X_{595\text{ nm}}$ vzorku v $t = 0$ min

X_{S100} je hodnota $X_{595\text{ nm}}$ vzorku v $t = 100$ min

X_{NC0} je hodnota $X_{595\text{ nm}}$ negativní kontroly v $t = 0$ min

X_{NC100} je hodnota $X_{595\text{ nm}}$ negativní kontroly v $t = 100$ min

Pokud je v některé z připravených koncentrací vzorku stanovena větší než 30% inhibice nárstu buněčné hustoty ve srovnání s negativní kontrolou, indikuje to cytotoxické účinky vzorku.

B.3.10 Příprava zásobní kultury (volitelné)

Komerčně dostupné kmeny (např. Česká sbírka mikroorganismů, firma Xenometrix) se před jejich kultivací uchovávají podle podmínek daného výrobce. Z těchto bakterií je vhodné si vytvořit zásobní kulturu, která se uchovává v ultrakryostatu při -70°C pro provádění dalších testů, následujícím postupem.

Bakteriální kmeny se kultivují za sterilních podmínek v růstovém médiu při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin za využití třepačky cca 150 rpm.

Následující den se kličkou rozočkuje kultivovaná bakteriální kultura na připravenou a vysušenou miskou s ampicilinovým agarem (AAG). Takto připravená miska se kultivuje při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin (popřípadě 48 hodin) aby bylo dosaženo růstu samostatných kolonií na misce. Samostatná kolonie se přenese na novou AAG, následuje opět kultivace při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 hodin.

Samostatná kolonie se přenese z misky s AAG do erlenmeyerovy baňky s 20 ml živného bujonu a inkubuje se při $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ přes noc (12 hodin). Po 12 hodinové inkubaci se provádí zamražení kmenů, pokud není před tím nutné provést ověření jejich genetických vlastností.

Genetické vlastnosti se u kmenů salmonel firmy Xenometrix nemusí kontrolovat, jejich ověření garantuje výrobce, u kmenů z České sbírky mikroorganismů se při ověření jejich genetických vlastností postupuje podle Přílohy A ISO 11350.

Ampicilinový agar

Příprava misek s ampicilinovým agarem musí probíhat za sterilních podmínek.

Ve 100 ml demineralizované či destilované vody se rozpustí:

- 1,5 g agaru
- 1,88 g živného bujonu (nutrient broth powder)
- 0,124 g NaCl

Obsah se promíchá, dá sterilizovat do autoklávu. Agar se zchladí na $38^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ a přidá se 100 μl ampicilinového roztoku. Petriho misky se naplní přibližně 25 ml (cca 5 – 7 mm) ampicilinového agaru. Po ztuhnutí agaru se misky převrátí dnem vzhůru a uchovávají po dobu 1 měsíce v lednici. Kondenzovaná voda na miskách se před testem odstraní jejich vysušením při $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Zamrazování kmenů

- na 20 ml noční kultury se přidá 1,8 ml DMSO nebo
- na 20 ml noční kultury se přidá 4 ml glycerolu.

Kmen se napipetuje po objemu 0,5 ml do kryozkumavek a uchovává se při -70°C .

Ze zmrazených kultur se může popsáním způsobem opakovaně připravit zásobní kultura, mělo by ale dojít k ověření genetických vlastností kmenů (rezistence na ampicilin, citlivost na krystalovou vilotet', UV citlivost viz ISO 11350).

B.3.11 Odkazy na normy

ISO 11350 Water quality – Determination of the genotoxicity of water and wastewater – Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)

B.4 Estrogenní účinek

B.4.1 Podstata zkoušky

Metoda zkoušky vychází z normy ISO 19040-1:2018. Tento kolorimetrický Yeast estrogen screen (YES) test využívá rekombinantních kvasinkových buněk *Saccharomyces cerevisiae* geneticky upravených tak, aby byly schopny exprese lidského estrogenního receptoru alfa. V přítomnosti látek, které aktivují estrogenní receptor (ER) dojde k indukci reportérového genu *lacZ*, který je součástí promotoru obsahujícího estrogen responzivní elementy a je tudíž kontrolován aktivitou ER. *lacZ* kóduje enzym β -galaktosidázu.

V závislosti na přítomnosti estrogenních látek ve vzorku dochází ke změně barvy indikátoru (CPRG) tak, že se látka naváže na estrogenní receptor, čímž iniciuje syntézu reportérového genu β -galaktosidázy, která je buňkou uvolněna do média ve kterém katalyzuje přeměnu žlutého substrátu CPRG na červený. Intenzita červené barvy souvisí s mírou estrogenní aktivity vzorku a vyhodnocuje se spektrofotometricky při OD₅₇₀ nm. Naměřená optická hustota (OD) přímo koreluje s množstvím vyloučené β -galaktosidázy a tudíž aktivity testované látky, která se navázala na receptor.

B.4.2 Zkušební organismus

Geneticky modifikovaný kmen kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*⁽²⁾ obsahující gen pro lidský estrogenní receptor alfa integrovaný do chromozomu buňky, a reportérový gen *lacZ* kódující enzym β -galaktosidázu a estrogen responzivní elementy.

Kvasinky mohou být skladovány při 4°C po dobu dvou týdnů v růstovém médiu. Pro použití v testu se přidá 0,5 mL kultury do 5 mL růstového média a kultivují se za kontinuálního třepání přes noc při 31 °C v kultivační láhvi o objemu 25 ml.

B.4.3 Přístroje a materiál

- Analytické váhy
- Autokláv
- Automatická pipety 2 – 20 μ l, 20 – 200 μ l, 200 – 1000 μ l, 1 – 10 ml
- Eppendorfovy zkumavky
- Inkubátor udržující teplotu 31 \pm 1°C
- Krycí membrány pro 96-jamkové desky, vzduchopropustné
- Kryogenní vialky, sterilní, 1ml
- Kultivační lahve T25 s uzávěrem opatřeným filtrem propouštějícím plyny, sterilní, 25 ml
- Lednice 4°C
- Mraznička -20°C
- Multikanálová pipeta
- Nádoba pro udržení vysoké vlhkosti (např. plastová krabice s těsnícím víkem obsahující navlhčené papírové ubrousky)
- Pipetovací rezervoáry
- Průhledné sterilní 96-jamkové destičky s rovným dnem
- Rukavice, laboratorní
- Spektrofotometr pro měření mikrotitračních desek schopný změřit absorbance ve vlnových délkách 570 \pm 20 nm a 690 \pm 20 nm
- Sterilní filtry, velikost pórů 0,2 μ m a 0,45 μ m

- Třepačka s orbitálním pohybem
- Vortex

B.4.4 Postup zkoušky

Provedení zkoušky je vázáno na nákup testovacích setů. Postup zkoušky přesně definuje komerční dodavatel testovacích setů. Ten také poskytuje specializovaný software pro vyhodnocení výsledků. Veškerá potřebná činidla jsou součástí YES TEST kitu (Xenometrix, New Diagnostics).

Výsledky a grafy se automaticky vygenerují po vyplnění údajů a překopírování naměřených spektrofotometrických dat.

B.4.5 Posouzení rizika estrogenních účinků

K posouzení rizika estrogenní účinků znečištění vod se používá úroveň zahuštění znečištění, která v provedených testech vykazuje statisticky významné zvýšení indukcie reportérového genu *lacZ*. Indikující je výše úrovně zahuštění nižší než 125x (viz tab. 1B4).

V tab. 1B4 jsou uvedeny stupně rizika herbicidních účinků znečištění v závislosti na limitních hodnotách zahuštění znečištění.

Tab. 1B4: Limitní hodnoty zahuštění znečištění pro určení stupně rizika chronických účinků

Zahuštění	Stupeň rizika
500x	II. zanedbatelné riziko
125x	III. maximálně přípustné riziko
63x	IV. zvýšené riziko
1x	V. vážné riziko

B.4.6 Kontrola řízení kvality

Součástí každého experimentu je test s pozitivní kontrolou (17 β -estradiol, E2), která slouží zároveň jako referenční látka pro ověření citlivosti kvasinek v testu.

Hodnota EC₅₀ by se dle normy ISO 19040-1 měla pohybovat v rozmezí 8,5 - 76 ng/l.

B.4.7 Odkazy na normy

ISO 19040-1:2018 Water quality - Determination of the estrogenic potential of water and waste water - Part 1: Yeast estrogen screen (*Saccharomyces cerevisiae*).

C. URČENÍ CHARAKTERU TLAKŮ

Na základě výsledků specializovaných testů, zaměřených na detekci možných dlouhodobých účinků znečištění vod, lze určit charakter tlaků, které mají přímý vliv na ekologický stav vodních útvarů. Níže je uvedena tabulka s výčtem významných látek, u kterých je známo, že daný negativní biologický účinek mají. Sledování výskytu těchto látek v dotčeném vodním útvaru umožní zefektivnění nákladů na monitoring, sloužící k identifikaci významných antropogenních vlivů, jejich tlaků a dopadů. Prioritní tlak, ovlivňující ekologický stav vodního útvaru, na který by se měl zaměřit průzkumný monitoring, určuje negativní biologický účinek s nevyšším stupněm rizika, stanoveným danou zkouškou.

Negativní biologický účinek	Významné složky znečištění vod
Chronická toxicita	aldrin, azulen, alachlor, benzo[k]fluoraten, butyl-benzyl-ftalát, DDT, 1,2 dichlorbenzen, 3,4 dichlorfenol, chloridazon, fenanthren, glyfosfát, heptachlor, kumen (izopropylbenzen), methylnaftalen, methylpyrrolidon, naftalen, nonylfenol, lindan (γ -hexachlorcyklohexan), pentachlorbenzen, propylbenzen
Herbicidní účinek	acetochlor, alachlor, chloridazon, chlorotoluron, isoproturon, dimethachlor, formaldehyd, glyfosfát, chlorotoluron, lindan (γ -hexachlorcyklohexan), metazachlor, metolachlor, N'-(3,4-dichlorfenyl)-N,N-dimethyl (močovina), simazin, terbuthylazin
Genotoxicita	anilin, anthracen, benzidin, bisfenol A, dinitrotoluen, 4,4'-diaminodifenylmethan, chloroform, chlordekon, dioxin, heptachlor, dichlorfenoly např. 3,4 dichlorfenol, benzen, benzofenon, benzo[a]antracen, benzo[a]pyren, fenanthren, formaldehyd, glyfosfát, lindan (γ -hexachlorcyklohexan), metazachlor, metolachlor, naftalen, nitrosaminy, nonylfenol, styren, PCB: benzo[a]pyren, benzo[b]fluoraten, benzo[k]fluoraten, benzo[ghi]perylen, dibenz[ah]antracen, fluoranthen, polyhalogenové uhlovodíky (PCB/TCDD/F), kovy s genotoxickým účinkem – arsen, šestimocný chrom, nikl, kadmium, olovo
Estrogenita	některé pesticidy (chlordan, diethylstilbestrol, DDT, endosulfan, hexachlorbenzen, hexachlorcyklohexan, methoxychlor, vinclozolin, linuron, atrazine, chloredecon, chlorpyrifos atd.), bisfenol A, benzofenon, dioxin, nonylfenol, PCDD/TCDD, PAU, PCB, tribultin, ethylhexyl metoxycinamát, ftaláty (např. bis(2-ethylhexyl)-ftalát, butyl-benzyl-ftalát), rtuť, benzo[a]pyren

Poznámka:

Při znalosti významných zdrojů znečištění lze v prvním kroku účelově prioritizovat výběr zkoušky pro stanovení možného negativního biologického účinku. Například u vodního útvaru v oblasti intenzivní zemědělské činnosti je vhodné prioritně provést stanovení možných

herbicidních účinků znečištění vod. Pod většími městskými aglomeracemi lze předpokládat estrogení účinky znečištění, podprůmyslovými agromeracemi pak genotoxicitu a chronickou toxicitu.