

## **Priedas VII A. Ekotoksikologiniai tyrimai. Metodika**

Visi tirpalai, atgabenus į laboratoriją, buvo nedelsiant filtruojami pro dvigubą popierinį (menturdumblų testui) ir membraninį 0.45 μ filtrą (vėžiagyvių testui), talpinami į šaldytuvą (4-6°C) ir ne vėliau kaip po 7 dienų testuojami, išskyrus bandinį Nr.24 iš UAB "Rokiškio vandenys", kurio toksiškumas vėžiagyvių testu buvo tiriamas po 27 d.

AAA ATD Hidrobiologijos ir ekotoksikologijos skyriuje gauti mėginiai buvo nedelsiant filtruojami pro MILLIPORE filtrinį popierių (Cat.Nr. FP 10324000) ir membraninį 0,45μ filtrą ir pavasario-vasaros laikotarpio mėginiai buvo patalpinami į šaldytuvą prie (-20)° C (prieš tai mėginiai buvo išpilstyti į atskirus indelius po 500 ir 50 ml); rudens laikotarpio mėginiai buvo patalpinami į šaldytuvą prie (4±2)° C ir testuojami ne vėliau kaip po 7 dienų.

### **MENTURDUMBLIŲ TESTAS (CHARATOX)**

#### **GĖLOJO VANDENS TOKSIŠKUMO TYRIMAS, PANAUDOJANT MENTURDUMBLIŲ ELEKTROFIZIOLOGINĘ REAKCIJĄ**

Toksiškumas siejamas su makrofitinių dumblų *Nitellopsis obtusa* ląstelių ramybės potencialo (RP) depolarizacija, t.y. jo absoliutinio dydžio sumažėjimu paveikus tiriamuoju mėginiu. Nuodingumas įvertinamas toksikanto koncentracija (IC<sub>50</sub>), kuriai esant vidutinis RP dydis ekspozicijos periodo pabaigoje sumažėja 50 % lyginant su jo dydžiu, nustatytu ląstelėms esant kontroliniame tirpale prieš poveikį. Testas atliekamas panaudojant specializuotą įrangą, susidedančią iš 1 ar 2 testavimo kamerų, talpinančių po 32 ląsteles geldelėse su įtaisytomis registravimo elektrodais; signalų perdavimo įrenginio "Akstis", jungiamo per nuosekliąją sąsają prie personalinio kompiuterio; ir testo valdymo programinės įrangos, kuri leidžia pasirinktu dažniu matuoti ir kaupti RP vertes bei vizualizuoti jas grafiškai ir skaitmeniniu pavidalu.

#### **1. Menturdumblų surinkimo gamtinėse augimvietėse ir jų laikymo laboratorijoje sąlygos**

Dumbliai yra traukiami daugiadančių inkaro formos kabliu augimvietėse iš kelių metrų gylio ir po to transportuojami į laikymo vietą pakankamai erdviuose talpose su vandens telkinio vandeniu. Šviežiai surinktus dumblus reikia kaip galima greičiau apdoroti, atskiriant žirklėmis nuo gniužulo 3-10 cm ilgio tarpubamblines ląsteles. Laikant neapdorotus dumblus laboratorijoje ilgiau, būtina kas 1-2 dienas praplauti dumblus ir keisti talpose esantį vandenį (tinka nechloruotas vandentiekio vanduo). Atrinktos ląstelės laikomos esant kambario apšvietimui ir temperatūrai, stikliniuose induose, maždaug 250 ląstelių vienam litrai, šios sudėties terpėje: 1/2 vandens telkinio ir 1/2 vandentiekio vandens. Terpė keičiama maždaug kas du mėnesius. Taip laikomos ląstelės yra tinkamos biotestuoti (paprastai 4-5 mėnesius), jei referentinės medžiagos toksiškumo vertė patenka į nurodytąsias ribas.

#### **2. Skiedimo (kontrolinės) terpės paruošimas**

Į 1 L graduotą indą įpilti apie 0,8 L distiliuoto vandens;

Iš pradinių 100 mM koncentracijos tirpalų supilti 1 mL KCl, 5 mL CaCl<sub>2</sub>, 10 mL NaCl ir 10 mL buferio HEPES, pH7.5;

Papildyti indą iki 1 L žymos distiliuotu ar bidistiliuotu vandeniu;

Nustatyti skiedimo (kontrolinės) terpės pH, pridėdant 0.1 M HCl arba 1.0 M NaOH tirpalo.

#### **3. Praskiestų toksikanto tirpalų gamyba**

Testuojamos cheminės medžiagos ar nuotekų skiedimai atliekami pagal standartines (geometrinės progresijos) procedūras, taikomas diapazono suradimo ir IC<sub>50</sub> nustatymo testams. Kiekvienam skiedimui reikia 100 mL tirpalo 8 ląstelių grupei.

#### **4. Dumblų ląstelių ptheadaptacija ir perkėlimas į testavimo kamerą**

12-24 val. prieš atliekant biotestą, reikiamas ląstelių kiekis perkeliamas iš laikymo indo į Petri lėkštelę su skiedimo terpe.

Ląstelė testavimo kameroje talpinama taip, kad vienas jos bamblys patektų į bendrą ląstelių grupę centrinį griovelį, o didesnėji ląstelės dalis atsidurtų atskiroje testavimo geldelėje, kurią elektriškai nuo centrinio griovelio atskiria vazelinas izoliaciniame tarpelyje.

Prieš dedant į testavimo kamerą ląstelę trumpam apdžiovinti ore;

Kiekvieną ląstelę atsargiai įspausti į vazeliną ir plokščiaja mentelės dalimi aplink apspaudyti, kad neliktų oro tarpelių tarp ląstelės ir vazelino;

Užpildyti testavimo ir referentinę geldelės skiedimo tirpalu;

Centrinį griovelį užpildyti KCl-terpe šios sudėties: 100 mM KCl, 1 mM NaCl, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> ir 1 mM buferio HEPES, pH 7,5 (koreguoti pridėdant 0.1 M HCl arba 1.0 M NaOH tirpalo);

Paleidžiama testo valdymo programa, leidžianti stebėti ląstelių RP reikšmių pokyčius, užduodamas būsimos duomenų failo pavadinimas;

Prieš pradėdant toksikanto tirpalų testavimą, sudėtas ląsteles adaptuoti testavimo kameroje 1-2 val. kol ląstelių ramybės potencialo reikšmės nusistovės, t.y. vidutinė RP reikšmė nuo laisvai pasirinkto momento per 30 min pakis ne daugiau, kaip ±5%.

#### **5. Dumblų inkubavimas ir ląstelių ramybės potencialo matavimas**

Testavimo kamera su ląstelėmis laikoma temperatūroje 21±3°C, esant išsklaidytam apšvietimui. Kiekviena testuojamojo tirpalo koncentracija tiriama atskira grupe iš 8 ląstelių.

Užrašyti nusistovėjusio ląstelių RP vertes;

Pakeisti kontrolinę terpę atitinkamu toksikanto tirpalo skiedimu kiekvienoje ląstelių grupėje (8-iose testavimo ir 1-oje referentinėje geldelėje) ir užfiksuoti testuojamojo tirpalo poveikio pradžios laiką;  
Po 90 min. užrašyti ląstelių RP vertes, sustabdyti programą, išimti ląsteles ir praplauti testavimo geldeles distiliuotu vandeniu.

### 6. Duomenų apdorojimas

Apskaičiuoti atitinkamų ląstelių grupių vidurkius prieš (RP<sub>0</sub>) ir po (RP<sub>90</sub>) ekspozicijos kiekvienoje koncentracijoje;

Apskaičiuoti depoliarizacijos procentą kiekvienoje koncentracijoje:  $Dep \% = (1 - RP_{90}/RP_0) \times 100\%$ ;

Rasti menturdumblių ląstelių ramybės potencialo inhibavimo koncentraciją IC<sub>50</sub>, pasinaudojus S-formos netiesine regresija, imant visus taškus arba tiesine regresija, imant koncentracijas, sukėlusias 50 ± 30% depoliarizaciją;

Jei 100 % tiriamojo tirpalo koncentracija nesukėlė didesnės, nei 50 % RP depoliarizacijos, užfiksuoti depoliarizacijos procentą.

### 7. Testo galiojimas

Skaičiuojant ląstelių grupės depoliarizacijos procentą, neįtraukiamos RP<sub>0</sub> ir RP<sub>90</sub> reikšmės ląstelių, kurių RP<sub>0</sub> reikšmių absoliutiniai dydžiai po adaptacijos testavimo kameroje prieš poveikio pradžią mažesni, nei 140 mV, ir tų ląstelių, kurios atsitiktinai buvo pažeistos tirpalų keitimo metu.

Ląstelių grupės depoliarizacijos procentas neįtraukiamas į IC<sub>50</sub> skaičiavimą, jei jis apskaičiuotas mažiau, nei iš 5 ląstelių.

IC<sub>50</sub> reikšmė turi būti randama panaudojant bent 3 koncentracijas, kurių sukeltas depoliarizacijos reikšmių diapazonas apglėbia 50 % depoliarizacijos tašką.

### 8. Referentinis testas

Rekomenduojama kas mėnesį arba atgabus naujai surinktus dumblius atlikti kontrolinį testo galiojimo bandymą. Tuo įsitikiname, ar laikomasi testo atlikimo procedūros ir nepakito testorganizmų jautrumas.

Referentinį testą galima, pavyzdžiui, atlikti naudojant kalio bichromato (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) tirpalą, taikant šią skiedimų seką: 0,45 – 0,6 – 0,9 – 1,2 g/L. Referentinio testo IC<sub>50</sub> reikšmė 0,77g/L (0,62-0,92).

## KREVEČIŲ TESTAS (THAMNOTOXKIT F™)

### GĖLOJO VANDENS ŪMINIO TOKSIŠKUMO TYRIMAS, PANAUDOJANT KREVEČIŲ LETALUMO REAKCIJĄ

Testo rinkinyje *Thamnotoxkit* yra visos medžiagos, tarp jų testorganizmų *Thamnocephalus platyurus* kiaušinėliai, reikalingos atlikti 6 standartizuotus gėlojo vandens ūminio toksiškumo testus arba 5 toksiškumo ir 1 referentinį testą. Testuojant naudojamos krevečių lervutės (II-III stadijos), išsiritusios iš kiaušinėlių po paros.

#### 1. Standartinės perinimo arba skiedimo terpės paruošimas

Į 1 L graduotą kolbą įpilti apie 0,8 L dejonizuoto vandens;

Supilti 5\* buteliukų, pažymėtų skaičiais nuo 1 iki 4, tirpalus iš eilės, pagal numeraciją;

Pripildyti kolbą iki 1 L žymos.

\* Pastaba: panaudoti abu buteliukus su užrašu "CaSO<sub>4</sub>".

#### 2. Terpės laikymas

Jei testai neatliekami per kelias dienas nuo terpės pagaminimo, laikyti terpę tamsoje šaldytuve. Išėmus iš šaldytuvo leisti terpei palaipsniui sušilti iki kambario temperatūros ir tik tuomet ją naudoti.

#### 3. Kiaušinėlių (cistų) perinimas

Perinimą pradėti 24 val. prieš testavimą.

Pagaminti perinimo terpę, imant 1 dalį Standartinės terpės ir 8 dalis dejonizuoto vandens, pvz., 2,5 ir 17,5 mL;

Prehidratuoti *Thamnocephalus* kiaušinėlius, įpilus maždaug 1 mL perinimo terpės į buteliuką su kiaušinėliais ir reguliariai suplakant užkimštą buteliuką apie 30 min;

Supilti buteliuko su kiaušinėliais turinį į mažą Petri lėkštutę prieš tai į ją įpilus 10 mL perinimo terpės; įsitikinti, ar dauguma cistų atsidūrė lėkštutėje, praskalaujant buteliuką standartine terpe. Švelniai pasukti lėkštutę, kad cistos pasklistų tolygiai;

Uždengti Petri lėkštutes ir inkubuoti 20-22 val., esant 25°C±2°C ir 3000 – 4000 lx apšvietimui.

Krevetės išsiritą per 20-22 val. nuo perinimo pradžios (pirmoji lervučių stadija). Dar po keturių valandų krevetės pasiekia antrą-trečią stadiją ir gali būti naudojamos testui.

#### 4. Praskiestų toksikanto tirpalų gamyba

Testuojamos cheminės medžiagos ar nuotekų skiedimai atliekami pagal standartines (geometrinės progresijos) procedūras, taikomas diapazono suradimo ir LC<sub>50</sub> nustatymo testams, pvz., USEPA, 1985; Thamnotoxkit F™, "Standard Operational Procedure"). Kiekvienam skiedimui reikia 10 mL tirpalo.

#### 5. Testavimo plokštelės užpildymas

Testai atliekami panaudojant vienkartinės plastikinės testavimo plokšteles, turinčias 24 geldeles (6Hx4V). Geldelės plokštelėje sunumeruotos eilėmis iš viršaus nuo A iki D ir stulpeliais iš kairės dešinėn nuo 1 iki 6.

Į keturias 1-ojo stulpelio kontrolines geldeles įpilti po 1 mL standartinės terpės;

Panašiai užpildyti kitų stulpelių (2 – 6) geldeles didėjančių koncentracijų seka.

Žiūrint pro mikroskopą (didinimas 10–12x), pernešti mikropipete po maždaug 50 krevečių lervučių iš perinimo lėkštutės į skalavimo\* geldeles D eilėje (lervučių skalavimas prieš perkeliant jas į testavimo geldeles sumažina nepageidaujama, tačiau neišvengiama praskiedimą);

#### **6. Krevėčių jauniklių pernešimas į testavimo geldeles**

Žiūrint pro mikroskopą (didinimas 10–12x), pernešti mikropipete po maždaug 50 krevečių lervučių iš perinimo lėkštutės į skalavimo\* geldeles D eilėje (lervučių skalavimas prieš perkeliant jas į testavimo geldeles sumažina nepageidaujama, tačiau neišvengiama praskiedimą);

Iš 1-ojo stulpelio skalavimo geldelės pernešti po 10 lervučių į kitas tris geldeles tame pačiame stulpelyje; stengtis atlikti lervučių pernešimą su kuo mažesniu tirpalo kiekiu;

Panašiai pernešti lervutes į atitinkamas 2–6 stulpelio geldeles.

#### **7. Krevėčių inkubavimas ir duomenų gavimas**

Sudėjus krevėčių lervutes, uždengti plokštelę parafilmo juosta, uždėti dangtelį ir inkubuoti tamsoje, esant 25°C temperatūrai;

Po 24 val. suskaičiuoti mirusias\* krevėčių lervutes ir kiekvienos toksikanto koncentracijos poveikio rezultata įrašyti testo lape;

\* *Krevėčių lervutės laikomos mirusiomis, jei per 10 s nestebime nei vidinio, nei išorinio judesio.*

Apskaičiuoti procentinį mirtingumą ir apskaičiuoti 50 % veikliąją koncentraciją (pvz., pagal USEPA, 1985).

#### **8. Testo galiojimas**

Be kitų specifinių testo atlikimo reikalavimų, nurodytų standartinėje darbo procedūroje, mirusių krevėčių skaičius kontrolėje, o tai visuotinai priimta vandens toksiškumo testams, neturi viršyti 10%.

#### **9. Referentinis testas**

Rekomenduojama kas 5 – 10 testų atlikti kontrolinį testo galiojimo kokybės bandymą. Periodiškai atlikdami šį testą įsitikiname, ar laikomasi testo atlikimo procedūros ir nepakito testorganizmų jautrumas.

Kokybės patikrinimo testą galima, pavyzdžiui, atlikti naudojant referentinį kalio bichromato ( $K_2Cr_2O_7$ ) toksikantą, ištirpinus 100 mg kalio bichromato 100 mL dejonizuoto vandens (1000 ppm pradinis tirpalas) ir taikant šią skiedimų seką: 0,32 – 0,18 – 0,10 – 0,056 – 0,032 mg/L.

Referentinio testo 24 val.  $LC_{50}$  reikšmė turi patekti į nurodytąsias ribas Thamnotoxkit F ■ specifikacijoje, gaunamoje su testorganizmų siunta.

#### **VERPEČIŲ TESTAS (ROTOXKIT F™)**

#### **GĖLOJO VANDENS ŪMINIO TOKSIŠKUMO TYRIMAS, PANAUDOJANT VERPEČIŲ LETALUMO REAKCIJĄ**

Verpečių testo rinkinyje *Rotoxkit* yra visos medžiagos, tarp jų testorganizmų *Brachionus calyciflorus* kiaušinėliai (cistos), reikalingos atlikti 6 standartizuotus gėlojo vandens ūminio toksiškumo veikliosios koncentracijos ar diapazono testus arba 5 toksiškumo ir 1 referentinį testą. Testuojant naudojamos verpečių jaunikliai, išsiritę iš kiaušinėlių po dienos perinimo.

#### **1. Standartinės perinimo arba skiedimo terpės paruošimas**

Į 1 L graduotą indą įpilti apie 0,8 L dejonizuoto vandens;

Supilti 5\* buteliukų, pažymėtų skaičiais nuo 1 iki 4, tirpalus iš eilės, pagal numeraciją;

Pripildyti indą iki 1 L žymos.

\*Pastaba: panaudoti abu buteliukus su užrašu "CaSO<sub>4</sub>".

#### **2. Terpės laikymas**

Jei testai neatliekami per kelias dienas nuo terpės pagaminimo, laikyti terpę tamsoje šaldytuve. Išėmus iš šaldytuvo leisti terpei palaipsniui sušilti iki kambario temperatūros ir tik tuomet ją naudoti.

#### **3. Kiaušinėlių (cistų) perinimas**

Perinimą pradėti 24 val. prieš testavimą.

Įpilti 2 mL Standartinės terpės į perinimo griovelį plokštelės kairiojoje dalyje;

Supilti buteliuko su kiaušinėliais turinį į griovelį prieš tai į jį įpilus 0,5 mL terpės; įsitikinti, ar dauguma cistų atsidūrė lėkštutėje, praskalaujant buteliuką standartine terpe;

Uždengti plokštelę parafilmo juosta ir inkubuoti 16-18 val., esant 25°C±2°C ir 3000 – 4000 lx apšvietimui. Jei verpečių išsiritimas vėluoja, o tai dažniausia esti dėl žemesnės, nei būtina, temperatūros, tikrinti kas valandą (po 18 val. nuo perinimo pradžios), ar verpetės neišsiritė. Svarbu, kad testui būtų panaudoti ne vyresni, nei 2 val., jaunikliai.

#### **4. Praskiestų toksikanto tirpalų gamyba**

Išsiritus verpetėms pagaminti testuojamos cheminės medžiagos ar nuotekų skiedimus pagal pasirinktas standartines procedūras (pvz., USEPA, 1985; Rotoxkit F™, "Standard Operational Procedure"). Kiekvienam skiedimui reikia 10 mL tirpalo.

#### **5. Testavimo plokštelės užpildymas**

Testai atliekami panaudojant vienkartinės plastikinės daugianarės testavimo plokšteles. Kiekvienoje plokštelėje yra ištisinis perinimo griovelis, 6 mažesni grioveliai, skirti verpečių skalvimui prieš galutinį pernešimą į testavimo geldeles, ir 36 testavimo geldelės. turinčias 24 geldeles (6Hx4V). Geldelės plokštelėje sunumeruotos eilėmis iš viršauspradedant X (kontrolinė eilė), toliau nuo 2 iki 5 (didžiausia koncentracija) ir stulpeliais iš kairės dešinės nuo A iki F.

Užpildyti kontrolinę eilę, įpilant 0,7 mL standartinės terpės į skalavimo griovelį ir po 0,3 mL į 6 testavimo geldeles;

Panašiai užpildyti kitų stulpelių (1 – 5) geldeles didėjančių koncentracijų seka.

#### **6. Verpečių pernešimas į testavimo geldeles**

Žiūrint pro mikroskopą (didinimas 10–12x), pernešti mikropipete po maždaug 50 verpečių iš perinimo griovelio į skalavimo geldeles X (kontrolinėje) eilėje (lervučių "skalavimas" atitinkamos koncentracijos tirpalu prieš perkeliant jas į testavimo geldeles sumažina nepageidaujamą praskiedimą pernešant verpetes); Iš kontrolinės skalavimo geldės pernešti po 5 verpetes į šešias kontrolines geldeles; stengtis pernešti verpetes su kuo mažesniu tirpalo kiekiu;

Panašiai sukilnoti verpetes į atitinkamas 1–5 eilių geldeles.

#### **7. Verpečių inkubavimas ir duomenų gavimas**

Siekiant išvengti terpės išsilaistymo iš perinimo griovelio kilnojant parengtą inkubuoti plokštelę su verpetėmis, patartina nusiurbti tirpalą mikropipete.

Uždengti plokštelę parafilmu juosta, uždėti dangtelį ir inkubuoti tamsoje, esant 25°C temperatūrai;

Po 24 val. suskaičiuoti mirusias\* verpetes ir kiekvienos toksikanto koncentracijos poveikio rezultatą įrašyti testo lape;

\* Verpetės laikomos mirusiomis, jei per 5 s nestebime nei vidinio, nei išorinio judesio.

c) Apskaičiuoti procentinį mirtingumą ir apskaičiuoti 50 % veikliąją koncentraciją (pvz., pagal USEPA, 1985).

#### **8. Testo galiojimas**

Be kitų specifinių testo atlikimo reikalavimų, nurodytų standartinėje testo atlikimo protokole, mirusių verpečių skaičius kontrolėje, o tai visuotinai priimta vandens toksiškumo testams, neturi viršyti 10%.

#### **9. Referentinis testas**

Rekomenduojama kas 5 – 10 testų atlikti kontrolinį testo kokybės bandymą. Tuo įsitikiname, ar laikomasi testo atlikimo procedūros ir nepakito testorganizmų jautrumas.

Kokybės patikrinimo testą galima, pavyzdžiui, atlikti naudojant referentinį kalio bichromato ( $K_2Cr_2O_7$ ) toksikantą, ištirpinus 100 mg kalio bichromato 100 mL dejonizuoto vandens (1000 ppm pradinis tirpalas) ir taikant šią skiedimų seką: 32 –18 –10 –5,6 – 3,2 mg/L.

Referentinio testo 24 val.  $LC_{50}$  reikšmė turi patekti į nurodytąsias ribas specifikacijoje, gaunamoje su testorganizmų siunta.

### **GĖLAVANDENIŲ VIENALASČIŲ ŽALIŲJŲ DUMBLIŲ AUGIMO SLOPINIMO TYRIMAS (LST EN ISO 8692:2004 )**

#### **1. Taikymo sritis**

Šis metodas nurodo, kaip nustatyti nuotekų toksinį poveikį planktoninių dumblių augimui.

#### **2.Principas**

Terpėje, kuri paruošiama sumaišant atitinkamus mitybinių medžiagų koncentrato, vandens, skirtingus nuotekų kiekius, auginama Selenastrum capricornutum gėlavandenių dumblių rūšis. Tiriamieji tirpalai inkubuojami 72 valandas, laštelių tankis juose matuojamas kas 24 valandas. Augimo slopinimas yra nustatomas kaip augimo spartos sumažėjimas lyginant su kontrole, kuri inkubuojama identiškomis sąlygomis.

#### **3.Reagentai**

3.1.  $NH_4Cl$ , p.a 99.5%

3.2.  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , p.a.

3.3.  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , p.a.99%.

3.4.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , p.a.

3.5. 2-ojo kokybės lygio analizės vanduo

3.6.  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , p.a.

3.7.  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ , p.a.99%

3.8.  $H_3BO_3$ , p.a, 99,8%

3.9.  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , p.a, 99%

3.10.  $ZnCl_2$ , p.a, 98%

3.11.  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , 99%

3.12.  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ , p.a.99%

3.13.  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  p.a, 99%

3.14. Membraniniai filtrai, kurių porų skersmuo 0,2  $\mu m$ , ALBET.

3.15. Druskos rūgštis (HCl), 37%, p.p.a.

3.16. NaOH, p.a, 99%.

3.17. Dumblių kultūra-Selenastrum capricornatum (Algaltoxkit F™, MICROBIOTESTS, Belgija).

#### **4. Dumblių mitybinės medžiagos**

Paruošiami lentelėje nurodytos sudėties 4 pradiniai vandeniniai tirpalai. Pirmus tris steriliname autoklavuodami 15 min. 120°C temperatūroje. 4-to pradinio tirpalo neautoklavuojame.

Tirpalus laikyti tamsoje 4 ° C temperatūroje.

Mitybinės medžiagos	Koncentracija pradiniame tirpale	Galutinė koncentracija tiriamajame tirpale
1 pradinis tirpalas: mitybiniai makroelementai		

NH <sub>4</sub> Cl	1,5	g/l	15	mg/l
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,2	g/l	12	mg/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,8	g/l	18	mg/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,5	g/l	15	mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	g/l	1,6	mg/l
2 pradinis tirpalas: Fe-EDTA				
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	80	mg/l	0,08	mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	100	mg/l	0,1	mg/l
3 pradinis tirpalas: mikroelementai				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185	mg/l	0,185	mg/l
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	415	mg/l	0,415	mg/l
ZnCl <sub>2</sub>	3	mg/l	3 × 10 <sup>-3</sup>	mg/l
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,5	mg/l	1,5 × 10 <sup>-3</sup>	mg/l
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,01	mg/l	10 <sup>-5</sup>	mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7	mg/l	7 × 10 <sup>-3</sup>	mg/l
4 pradinis tirpalas: NaHCO <sub>3</sub>				
NaHCO <sub>3</sub>	50	g/l	50	mg/l

### 5. Prietaisai

Visa įranga, besiliečianti su tiriamąja terpe, turi būti pagaminta iš chemiškai inertinės medžiagos.

5.1. Dumblių auginimo inkubatorius su reguliuojamu apšvietimu ir radialine purtykle, CERTOMAT BS-1.

5.2. Spektrofotometras 6300 (UV/VIS), „JENWAY“. Skiriamoji geba 1nm. Jautrumas 0,001 absorbcijos vienetų. Turi 10 cm optinio kelio ilgio kiuvetes.

5.3. Vakuminės filtracijos įrenginys: siurblys „SUE 300Q“, slėgis 31 mBar. Filtrų laikiklis su gnybtu.

5.4. Centrifuga „Eppendorf 5804 R“, 6000 aps/min.

5.5. Analytinės svarstyklės „KERN 770-14“, svėrimo tikslumas- 0,0001 g.

5.6. Garų sterilizatorius „VARIOKLAV“.

5.7. pH-metras „InoLab 1“, tikslumas (0-14) pH  $\pm 0,01$  pH.

5.8. Aeracijos prietaisas, AQUAEL APR-300 su filtru. Oro kokybė tokia, kad aeravimas neužterštų mėginio.

5.9. Šaldytuvas „Electrolux“, 4  $\pm 2^{\circ}$  C.

### 6. Indai

6.1. Kultūrų kolbos, 250 ml kūginės kolbos su orą praleidžiančiais kamščiais.

6.2. Matavimo kolbos (1000 $\pm$ 0,4); (200 $\pm$ 0,15); (100 $\pm$ 0,1) ml A klasės.

6.3. Moro pipetės (100 $\pm$ 0,08); (25 $\pm$ 0,03) ml A klasės.

6.4. Graduotos pipetės (1,00 $\pm$ 0,006); (2,00 $\pm$ 0,01); (10 $\pm$ 0,05) ml A klasės.

6.5. 500 ml cheminės stiklinės.

### 7. Tirpalai

7.1. Mitybinių medžiagų koncentrato ruošimas

Mitybinių medžiagų koncentrato 1000 ml tūris ruošiamas taip:

į 100 ml 1-ojo pradinio tirpalo (4) įpilama po 10ml 2-ojo, 3-iojo, ir 4-ojo pradinio tirpalo. Praskiedžiama iki 1000 ml. 2-ojo kokybės lygio analizės vandeniu.

7.2. Mitybinės terpės ruošimas.

100 ml mitybinių medžiagų koncentrato skiedžiama vandeniu iki 1000 ml. Kiekvienam tyrimui ruošiamą naują mitybinę terpę. Kad susibalansuotų ji aeruojama 30 min. filtruotu oru. Tikrinamas tirpalo pH. Jei reikia, pH vertė, lygi 8,1 $\pm$ 0,2, pasiekama naudojant 1 mol/l koncentracijos druskos rūgšties arba 1 mol/l natrio šarmo tirpalus.

7.3 Druskos rūgšties (HCl), p.p.a, tirpalas: ; c(HCl)  $\approx$  0,50 mol/l

Į 951 ml vandens įpilama 41 ml koncentruotos druskos rūgšties, kurios tankis 1,185 ir gerai išmaišoma.

7.4 Natrio šarmo (NaOH), a.g, tirpalas,  $\approx$  20 g/l

Ištirpinama 20  $\pm$  0,01 g natrio šarmo 500 ml vandens. Praskiedžiama iki 1000 ml.

7.5. Sėjamosios kultūros paruošimas

Tiriamųjų dumblių sėjamoji kultūra turi būti paimta iš eksponentiškai augančios pradinės kultūros. Taigi, pradinė dumblių kultūra (DI 3.15), kad taptu eksponentiško augimo, pradedama ruošti prieš 3 paras iki tyrimo pradžios. Sumaišoma 1 tūrio dalis mitybinės terpės koncentrato su 8 tūrio dalimis vandens.

Pridedama pakankamai dumblių ląstelių tiek, kad, padidinus tūrį iki 10 dalių su vandeniu, ląstelių tankis jame būtų lygus 10<sup>4</sup> ląstelių viename mililitre. Auginama pradinė kultūra 3 paras tokiose pačiose sąlygose, kurios bus tyrimo eigoje (8). Po 3 parų ji turėtų būti eksponentinio augimo fazės ir pakankamo ląstelių tankio (10<sup>6</sup> ląstelių viename mililitre). Reikalingas sėjamosios kultūros tūris pasirenkamas atsižvelgiant į išmatuotą ląstelių tankį prieš pat tyrimą.

7.6. Tiriamųjų koncentracijų pasirinkimas

Atliekama 100%: 50%: 25%: 12.5%: 6.25% nuotekų skiedimų serija. Išmatuojamos tirpalų pH vertės.

Norint nustatyti nesąlygotą vandenilio jonų koncentracijos nuotekų toksiškumą, reikia pasiekti nuotekų pH vertę lygią 8,1 $\pm$ 0,2. Jeigu po 72 h žemiausia nuotekų koncentracija (6,25%) lyginant su kontrole inhibuoja

dumblių augimą virš 50%, sekantis testas atliekamas jau su žemesnėmis nuotekų koncentracijomis. Sekančioje serijoje aukščiausia nuotekų koncentracija pasirenkama būtent ta koncentracija, kuri pirmojoje serijoje buvo žemiausia iš koncentracijų slopinusių dumblių augimą 90-100%.

#### 7.7. Tiriamųjų koncentracijų ruošimas

##### 7.7.1. Bendri reikalavimai

Nuotekos nufiltruojamos per 0,2µm filtrus po vakumu. Tiriamieji tirpalai ruošiami matavimo kolbose sumaišant atitinkamus nuotekų, mitybinės terpės (7.2) ir sėjamosios kultūros (7.5) tūrius. Visose kolbose bendras tūris turi būti vienodas. Sėjamosios kultūros į kolbas pridedama tiek, kad tiriamuosiuose tirpaluose susidarytų pradinis  $10^4$  ląstelių mililitre tankis. Į kelias kolbas įpilama tik mitybinė terpė ir sėjamoji kultūra. Šie tirpalai tai - testo kontrolė. Paruošiama po 3 kiekvienos koncentracijos pakartojimus ir 6 kontrolės pakartojimus. Atitinkamai, paruošiamos kolbutės su kiekvienos tiriamos koncentracijos tirpalais be sėjamosios kultūros, tai nuliniai atskaitos taškai įvertinant dumblių ląstelių optinį tankį.

##### 7.7.2. Tiriamųjų koncentracijų ruošimo darbų seka:

1 lentelėje nurodytos nuotekų koncentracijos atitinkamos žymės matavimo kolbose.

Matavimo kolba (200 ml)	Nuotekų koncentracija
C <sub>0</sub>	0%( kontrolė)
C <sub>1</sub>	100%
C <sub>2</sub>	50%
C <sub>3</sub>	25%
C <sub>4</sub>	12,5%
C <sub>5</sub>	6,25%

1. Imamos šešios pažymėtos nuo C<sub>0</sub> iki C<sub>5</sub> 200±0,15 ml talpos matavimo kolbos.

C<sub>1</sub> kolba iki pusės užpildoma su filtruotomis nuotekomis ir įpilama mitybinių medžiagų : 2 ml 1pradinio tirpalo bei po 0,2 ml 2; 3 ir 4 pradinio tirpalo. Kolba pabaigiama užpildyti nuotekomis iki brūkšnio. Turinys atsargiai sumaišomas. C<sub>1</sub> kolboje paruošta 100% nuotekų koncentracija.

Į C<sub>0</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> matavimo kolbas įpilama po 100 ml dumblių mitybinės terpės.

Iš C<sub>1</sub> kolbos perpilama 100 ml tūrinio į C<sub>2</sub> matavimo kolbą. Turinys atsargiai sumaišomas. C<sub>2</sub> kolboje paruošta 50% nuotekų koncentracija.

Atitinkamai ruošiamos 25%;12,5% ir 6,25% nuotekų koncentracijos:

-100 ml iš C<sub>2</sub> į C<sub>3</sub> (25%)

-100 ml iš C<sub>3</sub> į C<sub>4</sub> (12,5%)

-100 ml iš C<sub>4</sub> į C<sub>5</sub> (6,25%)

Iš C<sub>5</sub> matavimo kolbos papildoma 100 ml tirpalo, kad tūris visose matavimo kolbose būtų vienodas (100 ml). Į visas kolbas pridedamas vienodas dumblių suspensijos tūris, kad pradinė dumblių ląstelių koncentracija kiekvienoje matavimo kolboje būtų vienoda, lygi  $1 \cdot 10^4$  ląst/ml.. Tūrinys atsargiai sumaišomas, kad dumblių ląstelės tolygiai pasiskirstytų kolbose.

Paruošti tiriamieji tirpalai perpilami po 25 ml į kultūrų kolbas(6.1) , kurios užkemšamos su orui pralaidžiais kamščiais.

#### 8. Inkubavimas

Kultūros kolbos sudedamos į dumblių auginimo inkubatorių (5.1) , kur apšviečiamos balta šviesa ir reguliariai purtomos. Jos inkubuojamos prie  $23 \pm 2$  °C .

#### 9. Optinio tankio matavimas

Kiekvienoje kultūros kolboje esančio tirpalo optinis tankis matuojamas kas 24 valandos . Matavimui naudojamos 10 cm (arba 1 cm) optinio kelio kiuvetės, kurios idealiai tinka JENWAY spektrofotometrui (5.2). Tirpalas iš kultūros kolbos perpilamas į 10 cm (arba 1 cm) kiuvetę. Prieš optinio tankio matavimus privalo būti atlikta spektrofotometro nulinė kalibracija. Nulinė kalibracija atliekama su 10 cm (arba 1 cm) optinio kelio kiuvete, užpildyta dumblių mitybine terpe, prie 670nm bangos ilgio. Po to išmatuojamas kiekvienoje kultūros kolboje esančio tirpalo optinis tankis. Prieš įstatant kiuvetę su tirpalu į kiuvečių lizdą, ji atsargiai vartoma 10s, kad užtikrinti tolygų dumblių ląstelių pasiskirstymą tirpale ir neiškreipt tirpalo optinio tankio. Optiniai tankiai lengvai perskaičiuojami į dumblių ląstelių skaičių iš optinio tankio ir dumblių ląstelių priklausomybės, kuri aprašyta kiekvienai dumblių kultūros serijai individualia formule(3.17) .

#### 10. Kokybės valdymas

Tyrimas nepatikimas kai:

augimo sparta mažesnė nei  $1,4 d^{-1}$  . O tai reiškia, kad ląstelių tankis per 72 val. nepadidėjo 67 kartus.

kontrolės variacijos koeficientas (CV) lygus 5% arba didesnis,

kontrolės pH vertės svyravimai tyrimo metu didesni nei 1,5 vieneto.

Jeigu taip atsitinka, reikia tikrinti tyrimo sąlygas arba keisti dumblių kultūrą.

#### 11. Skaičiavimas

##### 11.1. Augimo kreivių sudarymas

Sudaroma ląstelių tankio matavimų testuojamoje terpėje priklausomybės nuo matavimo laiko lentelė.

Nubraižomas kiekvienos koncentracijos bei kontrolės vidutinio ląstelių tankio logaritmo

priklausomybės nuo laiko augimo kreivės grafikas. Linijinė ląst. tankio kreivė rodo ląstelių eksponentinį

augimą , o nusistovėjęs ląstelių tankio lygis (plato) rodo, kad kultūra pasiekė stacionarę fazę. Jeigu kontrolė rodo mažėjantį augimo tempą artėjant prie ekspozicijos pabaigos, tuomet augimo slopinimas

tiriamuosiuose tirpaluose gali sutapti su kontrole. O tai, skaičiuojant rezultatus, iškreips, sumažins inhibicinį

jų poveikį. Šiuo atveju tikslinga atlikti augimo spartos ir augimo slopinimo skaičiavimus pagal paskutinį kontrolės matavimą eksponentinio augimo periode.

### 11.2. Augimo sparta

Apskaičiuojama kiekvienos tiriamos kultūros vidutinė augimo sparta  $\mu$  pagal lygtį:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

$t_0$ - matavimo pradžia;

$t_L$ - matavimo pabaiga;

$x_0$ - pradinis ląstelių tankis;

$x_L$ -galutinis ląstelių tankis;

Apskaičiuojamas kiekvienos tiriamos koncentracijos augimo slopinimas procentais pagal lygtį:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_C - \mu_i}{\mu_C} * 100$$

$I_{\mu i}$ -tiriamos koncentracijos  $i$  augimo slopinimo procentas

$\mu_i$ -vidutinė tiriamosios koncentracijos  $i$  augimo sparta;

$\mu_C$ -vidutinė kontrolinio tirpalo augimo sparta;

### 11.3. $E_r C_x$ (pvz. $E_r C_{10}$ ir $E_r C_{50}$ ) nustatymas

Surašomi kiekvienos kultūros kolbos vidutiniai augimo slopinimai procentais ( $I_{\mu i}$ ) pagal atitinkamas tiriamas koncentracijas į lentelę, taškai atidedami pusiau logaritminėje skalėje. Jeigu taškų išsibarstymas didelis, atidedami pakartojimų vidurkiai su atitinkamu standartiniu nuokrypiu. Per taškus iš rankos brėžiama tiesė. Iš šio grafiko nustatoma  $E_r C_{50}$  (50% augimo slopinimą atitinkanti tiriamoji koncentracija).

Duomenų pateikimas

$E_r C_x$  vertės pateikiamos remiantis augimo sparta kaip  $E_r C_{10}$  arba  $E_r C_{50}$ . Būtinai nurodomas nustatymui sugaištas laikas, pvz.  $E_r C_{50}$  (0-72 val.). Rezultatas pateikiamas mg/l su dviem reikšminiais skaičiais po kablelio.

### 11.5 Duomenų aiškinimas

$E_r C_x$  vertės yra toksikologiniai duomenys, gauti laboratoriniame eksperimente, atliktame apibrėžtomis standartinėmis sąlygomis. Jie parodo potencialų kenksmingumą, bet negali būti tiesiogiai naudojami medžiagos poveikio padariniams nuspėti gamtinėje aplinkoje. Aiškinant  $E_r C_x$  vertes reikia atsižvelgti į augimo kreivių formą. Kai kurios šių kreivių savybės (vėluojantis augimo intensyvėjimas; geras, bet nereguliarus pradinis augimas) gali padėti suprasti duotosios toksinės medžiagos veikimo pobūdį.

## 12. Tyrimo ataskaita

Rezultatai

ląstelių tankis kiekvienoje kultūros kolboje kiekvieno matavimo metu kiekvienos tiriamos koncentracijos ir kontrolinio mišinio vidutinis ląstelių tankis kiekvieno matavimo metu augimo kreivės (ląstelių tankio logaritmas priklausomai nuo laiko) koncentracijos ir poveikio priklausomybė (slopinimo procentais priklausomybė nuo koncentracijos), pateikiama lentelėje arba grafiškai

$E_r C_x$  ( $E_r C_{10}$  ir  $E_r C_{50}$ ) vertės ir jų nustatymo metodas

kiti pastebėti efektai.

## 13. Bibliografija

1. LST EN ISO 8692 Vandens kokybė. Gėlavandenių vienląsčių žaliųjų dumblių augimo slopinimo tyrimas.
2. LST EN ISO 3696 Analizės vanduo. Apibūdinimas ir bandymo metodai.
3. Algatokit F™, MIKROBIOTESTS, Belgija.

## VIBRIO FISCHERI ŠVYTĖJIMA SLOPINANČIO POVEIKIO NUSTATYMAS (MICROTOX)

### 1. Taikymo sritis

Nuotekoms;

Vandeniniams ekstraktams ir išplovoms;

Gėlam vandeniui (paviršiniams arba požeminiams vandenims) arba sūriam ir sūrokam vandeniui, ypač vykdant bakterijų slopinimo pokyčių monitoringą; porų vandeniui.

### 2. Metodo esmė (principas) – veikimo mechanizmas

*Vibrio fischeri* kultūros švytėjimo slopinimas nustatomas darant įkrovos bandymą. Tai daroma kiuvetėje maišant tam tikrus mėginio arba praskiesto mėginio tūrius ir švytinčiųjų bakterijų suspensiją.

Testo metu liuminiscentiniai organizmai, esantys „Microtox Acute“ Reagente, eksponuojami su tirpalų pavidalo mėginiais ir matuojamas testo mikroorganizmų švytėjimo intensyvumo padidėjimas arba sumažėjimas.

Reagento sudėtyje yra gyva liuminescentinė bakterija, kuri buvo išauginta optimaliomis sąlygomis, surinkta ir po to liofilizuota (išdžiovinta iš užšaldytos būklės). Liofilizuota bakterija yra iš naujo sudrėkinama (Reconstitution solution) tirpalu ir gaunama tinkama naudoti organizmų suspensija.

Bandymo matas – švytėjimo, išmatuoto po 15 min ir 30 min, arba pasirinktinai po 5 min, mažėjimas, atsižvelgiant į pataisos faktorių ( $f_{kt}$ ), kuris yra kontrolinių mėginių švytėjimo intensyvumo pokyčio per sąveikos laiką matas. Vandens mėginio slopinamasis poveikis nustatytas kaip  $EC_{50}$  vertė, darant skiedimų seriją.

Nustatomas skiedimo laipsnis, kuris atitinka  $< 20\%$  švytėjimo slopinimą. Skiedimo ir poveikio santykis, esant didesnio slopinimo lygiams, gali būti nustatytas grafiškai arba taikant statistinę analizę.

### 3. Tikslumas

Kiekvienoje testo kiuvetėje apytiksliai būna milijonas testo organizmų, kurie sužadinami testuojamu mėginiu. Įvairavimas tarp atskirų organizmų pasidaro statistiškai nereikšmingas. Sistema matuoja vieną parametą – bendrą šviesos iš visų organizmų išėigą. Kiekviena Reagento vieno gamtinio įkrova, turinti liofilizuotus testo organizmus, yra paruošiama sąlygomis, palaikomomis griežtai kontroliuojamose ribose.

### 4 Trukdžiai

Netirpios, mažai tirpios arba lakiosios medžiagos, arba medžiagos, reaguojančios su skiedimo vandeniu arba su bandymo suspensija, arba pakeičiančios jų būseną vykstant bandymui, gali veikti bandymo rezultatus arba bloginti jų atkuriamumą.

Gali būti švytėjimo intensyvumo nuostolių dėl šviesos absorbcijos arba sklaidymo, jei vanduo labai spalvotas arba drumstas. Kartais šiuos trukdžius galima kompensuoti, pvz., naudojant absorbcijos pataisai daryti skirtą dviejų kamerų kiuvetę (žr. A priedą).

Kadangi biologinis švytėjimas vyksta, kai deguonies koncentracija  $> 0,5$  mg/l, mėginiuose, turinčiuose didelį deguonies poreikį (ir (arba) mažą deguonies koncentraciją), gali būti deguonies trūkumas ir tai slopinti švytėjimą.

Organinių lengvai suardomų maistinių medžiagų priemaišų buvimas mėginyje (pvz., karbamido, peptono, mielių ekstrakto, paprastai  $\geq 100$  mg/l) gali sukelti nuo teršalų nepriklausomą biologinio švytėjimo mažėjimą. Didesnė kaip 30 g/l NaCl druskų koncentracija pradiniam mėginyje arba kitų junginių kiekis, atitinkantis tokį pat osmolingumą, ir dar druskos pridėjimas darant bandymą gali būti per didelės osmozės reiškinių priežastimi. Jei ėminys turi 20 g/l - 50 g/l NaCl ekvivalentinį druskos kiekį, druskos dėti nereikia. Galutinė druskos koncentracija bandomuosiuose mėginiuose turi būti ne didesnė kaip 35 g/l natrio chlorido tirpalo osmolingumas.

### 5. Reagentai ir medžiagos

Turi būti naudojamos pripažintos kokybės analiziškai grynos cheminės medžiagos. Vanduo – antro kokybės lygio analizės vanduo.

#### 5.1. Bandymo bakterijos -Reagentas

Švytinčiųjų bakterijų, priklausantių rūšiai *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, štamai. Toksiškumo matavimui naudojamos bakterijų suspensijos ruošiamos iš prekyboje esančių liofilizuotų Reagentų. Microtox ūmaus toksiškumo testo Reagentas (Microtox Acute Toxicity Test Reagent) yra specialiai sudarytas bioreaktyvumo testavimui, pasižymintis jautrumu plačiai toksinių medžiagų grupei.

Reagentas yra specialiai atrinkto jūrinių bakterijų *Vibrio fischeri* (anksčiau žinomų kaip *Photobacterium phosphoreum*, NRRL numeris B-11177) kamieno liofilizuotas preparatas. Reagento buteliuke yra apytikriai šimtas milijonų testo organizmų.

Saugojimo laiko trukmė yra vieneri metai, esant  $(-18)^{\circ}\text{C}$  –  $(-25)^{\circ}\text{C}$ . Nereikia saugoti Reagento žemesnėje negu  $(-25)^{\circ}\text{C}$  temperatūroje. Saugojimas normalaus šaldytuvo temperatūroje žymiai sumažina galimą saugojimo laiką.

Reagentą reikia naudoti per laiko tarpą neviršijantį vienos arba dviejų valandų po atgaivinimo (reconstitution). Reagento jautrumas lieka, iš esmės, nepakitęs 1 – 2 val po atgaivinimo. Praėjus šiam laikui, kai kurių mėginių jautrumas gali žymiai pasikeisti. Todėl, jeigu reagentą reikia vartoti praėjus 90 min arba daugiau, jo veiklumas turi būti periodiškai tikrinamas standartu, tokiu kaip fenolis, kad būtų galima įvertinti jautrumo kitimą. Bakterijos pradeda švytėti iš karto atgavusios vandenį ir yra tinkamos naudoti bandyme.

#### 5.2 Natrio chlorido tirpalas - Skiediklis

Skiediklis - specialiai paruoštas netoksiškas 2% Natrio chlorido (NaCl) tirpalas, vartojamas praskiesti mėginiui ir reagentui. Jūrinei bakterijai, esančiai Reagente, reikia osmotinės apsaugos, kuri yra pasiekama 2% Natrio chlorido tirpalu. Saugojimo laiko trukmė - vieni metai, jei laikomas kambario temperatūroje.

20 g natrio chlorido (NaCl) ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 l antro kokybės lygio analizės vandeniu.

#### 5.3. Natrio hidroksido tirpalas, $c(\text{NaOH}) = 1$ mol/l

#### 5.4 Vandeniilio chlorido rūgšties tirpalas, $c(\text{HCl}) = 1$ mol/l

PASTABA - pH reguliuoti gali būti reikalingos didesnės arba mažesnės koncentracijos rūgštys arba šarmai.

#### 5.5 Tirpalas liofilizuotoms bakterijoms laikyti

- 20,0 g natrio chlorido (NaCl)

- 2,035 g magnio chlorido heksahidrato ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )

- 0,30 g kalio chlorido (KCl)

Ištirpinkite vandenyje ir praskieskite iki 1 l vandeniu. Tirpalą galima laikyti šaldiklyje esant  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 5.6. Atgaivinimo tirpalas (Reconstitution solution)



Atgaivinimo tirpalas - specialiai paruoštas, netoksiškas, ultra švarus vanduo (ultra pure water). Jo saugojimo trukmė yra vieni metai, jei laikomas kambario temperatūroje.

5.7. OAS –tirpalas osmotiniam slėgiui pasiekti (Osmotic Adjusting Solution)

OAS - specialiai paruoštas netoksiškas 22 % Natrio chlorido (NaCl) tirpalas, skirtas mėginio osmotiniam slėgiui priversti maždaug iki 2% Natrio chlorido.

Prireikūs pasiekti mėginio osmotinį slėgį, pridedama viena dalis OAS į 10 dalių mėginio:

$$(X \text{ ml mėginio} \times 0,1 = \text{ml OAS}), \text{ pvz., } 2,5 \text{ ml mėginio} \times 0,1 = 0,25 \text{ ml OAS}$$

Mėginio osmotinis slėgis taip pat gali būti pasiekiamas, pridedant sauso aukščiausio grynumo laipsnio NaCl. Saugojimo laiko trukmė – vieni metai kambario temperatūroje.

5.8 Etaloninės medžiagos

- Cinko sulfato heptahidratas ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )

- 3,5-dichlorfenolis ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$ )

## 6. Aparatūra

6.1. Microtox analizatorius 500 - matavimo celės temperatūra  $15 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ , bandomųjų mėginių blokas, užtikrinantis  $15 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūrą; celė pradinei suspensijai laikyti esant  $3 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  temperatūrai;

6.2. Šaldytuvas "Electrolux" – ( $4 \pm 2$ ) $^\circ\text{C}$ ; ( $-20 \pm 2$ ) $^\circ\text{C}$ ;

6.3. Kiuvetės pagamintos iš chemiškai inertinės medžiagos, pritaikytos microtox 500 analizatoriui. Kiuvetės naudojamos supilti mėginius, kontrolinius tirpalus ir Reagentą testavimo metu. Jos yra netoksiškos ir vienkartinės. Panaudotos kiuvetės negali būti patikimai išplautos pakartotiniam naudojimui. Ploviklių liekanos arba mėginio priemaišos trukdo sekančiam testavimui. Trukdymo nuo užterštumo rizika yra nepriimtina didelė.

6.4. pH-metras "InoLab 1", tikslumas (0-14) pH  $\pm 0,01$  pH.

6.5. Chronometras.

6.6. Stūmoklinės pipetės

Testavimo protokolai reikalauja pakartotino tikslaus (preciziško) mažų kiekių skysčių pernešimo, tokių mažų kaip 10  $\mu\text{l}$ . Tam naudojamos stūmoklinės pipetės:

2 ÷ 20  $\mu\text{l}$  – reguliuojamo tūrio stūmoklinės pipetės;

20 ÷ 200  $\mu\text{l}$  - reguliuojamo tūrio stūmoklinės pipetės;

100 ÷ 1000  $\mu\text{l}$  - reguliuojamo stūmoklinės pipetės;

1 ÷ 5 ml - reguliuojamo tūrio stūmoklinės pipetės.

6.7. Šaldomoji Centrifuga „Eppendorf 5804 R“, 12000 aps/min.

6.9. Vakuminės filtracijos įrenginys: siurblys „SUE 300Q“, slėgis 31 mBar. Filtrų laikiklis su gnybtu.

6.10. Konduktometras Portames Cond 911.

6.11. Analytinės svarstyklės „KERN 770-14“, svėrimo tikslumas- 0,0001 g.

6.12. Šaldytuvas-inkubatorius "FIOCCHETTI", tirpalų laikymui prie ( $15 \pm 1$ ) $^\circ\text{C}$ .

## 7. Mėginių rinkimas ir paruošimas

7.1. Mėginių ėmimas

Naudojami nauji, gerai išplauti borosilikatinio stiklo indeliai (nuo 30 iki 250 ml) su užsukamais dangteliais.

Indelį reikia užpildyti pilnai iki viršaus, nepaliekant oro erdvės.

Visiškas indelio užpildymas leidžia tirpale išlaikyti lakias medžiagas.

7.2. Mėginių saugojimas

Mėginius reikia testuoti, jei įmanoma, kaip galima greičiau po surinkimo, kadangi mėginio toksiškumas laikui bėgant gali kisti, taigi geriausia testuoti per 1 – 2 val po mėginio paėmimo (surinkimo), bet tai ne visada įmanoma.

Jei testavimą tenka atidėti, mėginiai saugomi normalioje šaldytuvo temperatūroje ir atšaldytą mėginį testuoti ne vėliau 48 val po surinkimo. Esant reikalui mėginiai iki tyrimo gali būti saugomi prie ( $-20$ ) $^\circ\text{C}$ , bet ne ilgiau kaip 2 savaites.

7.3. Drumstas mėginys

Jei mėginys yra drumstas, ir tai nepageidautina, mėginys centrifuguojamas, tinkamai parinkus greitį ir trukmę, kad būtų pašalintas drumstumas (priklausomai nuo drumstumo prigimties).

Drumstumas yra nepageidautinas, jei nereikalaujama nustatyti drumstosios medžiagos toksiškumo. Jei pageidautina nustatyti drumstumą sukeliančios medžiagos toksiškumą, mėginys necentrifuguojamas. Jei mėginys yra labai drumstas, kad būtų galima vykdyti Pagrindinį testą (Basic test), naudojama Standžios fazės testo (Solid phase Test) programa

7.4. Mėginio pH

Išmatuojamas ir užrašomas mėginio pH, kaip dalis informacijos apie mėginį.

Bakterinis Reagentas yra jautrus pH dydžiui. Tarp 6,0 ir 8,0 pH įtaka yra minimali. Jei pH yra aukštesnis už 8,0 arba žemesnis negu 6,0 ir mėginys turi buferinę talpą, efektas gali būti nepageidautinas.

PAVYZDYS: distiliuotas vanduo, kurio pH privedamas HCl iki pH 5,0, neturi pH poveikio, kadangi neturi pakankamai vandenilio jonų tam, kad paveiktų Reagento pH. Kitas tokio pat pH 5,0 tirpalo pavyzdys gali parodyti žymų tirpalo toksiškumą, jei jis turi buferinės talpos.

Jeigu mėginio pH yra žemesnis už 6,0 arba aukštesnis už 8,0, ir pH reikia priversti, pH privedamas kaip parodyta žemiau.

Privedimas yra reikalingas jei norime išvengti pH toksinės įtakos.

Jei pH yra žemiau 6,0, pH privedamas iki 6,0 su NaOH. Jei pertitruojamas, mėginys išmetamas ir ruošiamas iš naujo.

Jei pH yra aukščiau 8,0, privedamas iki 8,0 su HCl. Jei pertitruojamas, mėginys išmetamas ir ruošiamas iš naujo.

Jei mėginio pH yra žemiau 6,0, mėginio titravimas iki pH aukščiau už 6,0 gali sukelti nuosėdų susidarymą, ir tai gali pakeisti stebimąjį toksiškumą.

Jei mėginio pH yra aukščiau už 8,0, mėginio titravimas iki pH žemiau už 8,0 gali sukelti nuosėdų susidarymą, ir tai pakeičia stebimąjį toksiškumą.

Jei mėginys yra pertitruojamas, atgalinis titravimas susidariusių nuosėdų gali neištirpinti.

Jei mėginio buferinė talpa didelė, naudojama 5 N rūgštis arba bazė, kad būtų minimalus mėginio praskiedimas (tūrio padidėjimas).

Jei mėginio buferinė talpa silpna – naudojama 0,5 N rūgštis arba bazės tirpalai.

## 8. Standartas

### 8.1 Standarto paskirtis

Standarto (pamatinio arba lyginamojo) toksikanto, kurio testavimo rezultatai yra gerai apibūdinti, testavimas patvirtina testavimo Protokolo žinojimą ir patikrina visos testavimo sistemos (pav. t.y, analizatoriaus, Reagento, Skiediklio; Atgaivinimo tirpalo) veiksmingumą.

3 – Bazinis Testavimo Protokolas yra geriausia procedūra Standartų testavimui, kadangi ji užtikrina aukščiausią patikimumą lygį, tikslumą, lankstumą. Testuojant „Standartą“ niekada neišvedamas IC<sub>50</sub> duomuo ekstrapoliuojant, o visada testas kartojamas naudojant tinkamus „standarto „ praskiedimus.

### 8.2. Fenolio standartas

Fenolio IC<sub>50 5 min</sub> = nuo 13 iki 26 mg/l

Atsverti ~ 50 mg (0,050 g) kristalinio fenolio, (tai pagal standartą „Cheminė analizė“ reiškia, kad atsverti tiksliai, bet ne būtinai apvaliai 50 mg)) suberti į 500 ml tamsaus stiklo matavimo kolbą. Tiksliai mėginio (t.y fenolio) koncentraciją paskaičiuoti iš atsverto kiekio.

Įpilti skiediklio iki 500 ml žymos;

Užkimšti kolbą ir gerai išmaišyti, vartant kolbą;

Pažymėti kolbą ir saugoti normalaus šaldytuvo temperatūroje (2 – 8)°C.

Fenolio Standartas tinkamas 3 – 4 mėnesius, jei saugomas tokiu būdu.

PASTABA: Jeigu nėra tamsaus stiklo matavimo kolbos, visa matavimo kolba turi būti apvyniota aliuminio folija tam, kad FENOLIO STANDARTAS būtų apsaugotas nuo šviesos.

### 8.3. Cinko sulfato standartas

IC<sub>50 15 min</sub> - ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O = nuo 3 iki 10 mg/l;

IC<sub>50 15 min</sub> - Zn<sup>++</sup> = nuo 0.6 iki 2.2 mg/l.

Atsverti ~ 50 mg (0,050 g) ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O ir kiekybiškai suberti į 500 ml matavimo kolbą. Tiksliai koncentraciją paskaičiuoti iš atsverto kiekio.

Įpilti skiediklio iki 500 ml žymos;

Užkimšti kolbą ir gerai išmaišyti vartant kolbą;

Pažymėti kolbą ir saugoti normalaus šaldytuvo temperatūroje (2 – 8)°C.

Cinko Sulfato Standartas tinkamas vartoti 3 – 4 mėnesius, jei saugomas tokiu būdu.

PASTABA Jeigu nėra tamsaus stiklo matavimo kolbos, visa matavimo kolba turi būti apvyniota aliuminio folija tam, kad CINKO SULFATO STANDARTAS būtų apsaugotas nuo šviesos.

## 9. Procedūra

Ūminio toksiškumo nustatymas taikant Microtox<sup>R</sup> toksiškumo testavimo sistemos (Microtox 500 analizatorius), procedūrą (G<sub>L2</sub> – G<sub>L32</sub>), atitinkančią LST EN ISO 11348-3. Vandens kokybė. *Vibrio fischeri* švytėjimą slopinančio vandens mėginių poveikio nustatymas (Švytinčiųjų bakterijų tyrimas). 3 dalis. Metodas, naudojant sublimuotas bakterijas.

### 9.1 Pradinės suspensijos ruošimas

#### 9.1.1 Pradiniai paruošiamieji darbai

Paruoškite mėginius pagal 7.

Paruoškite reikiamą atskiestų tirpalų seriją (lentelė):

lentelė. Atskiestų tirpalų serijų ruošimas. Bandymo ir kontrolinių įkrovų sudėtis

Skiedimas	Skiedimo laipsnis D	Vandens mėginys μl	Skiedimo vanduo μl	Pradinė suspensija μl
1 į 1,25	1	800	-	200
1 į 2	2	500	-	500
1 į 3	3	333,3	166,7	500
1 į 4	4	250	250	500
1 į 6	6	166,7	333,3	500
1 į 8	8	125	375	500
1 į 12	12	83,3	416,7	500
1 į 16	16	62,5	437,5	500

1 į 24	24	41,7	458,3	500
1 į 32	32	31,3	468,7	500
Kontrolinės įkrovos kai D = 1		-	800	200
kai D ≥ 2		-	500	500

Mažiausia D vertė, kuriai slopinamasis poveikis  $H_t$  yra < 20 %, yra vadinama LID.

NaCl tirpalą (5.2) kontroliniams mėginiams laikykite esant  $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ .

Išimkite liofilizuotos kultūros buteliuką iš  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  šaldiklio prieš pat jos atstatymą vandenyje. Atstatymui 1 ml atgaivinimo tirpalo.

Supilkite visą šį atšaldyto vandens tūrį į buteliuką su liofilizuotomis bakterijomis, taip mažiau pakenksite ląstelėms vykstant pakartotinai hidratacijai.

Kadangi yra svarbu greitai įpilti vandenį, kad bakterijos galėtų staigiai gauti vandens, nenaudokite pipetės.

Tikslus vandens tūris neturi reikšmės.

Ši atstatytų švytinčiųjų bakterijų suspensija naudojama kaip pradinė suspensija; ji turi būti laikoma pradinės suspensijos laikymo celėje (microtox 500 analizatorius), kurioje palaikoma  $3\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$  temperatūra. Pradinė suspensija gali būti naudojama bandymams tol, kol ji atitinka tinkamumo kriterijus. Pakartotinai atšaldytos ir iš naujo hidratuotos bakterijos gali būti naudojamos tik parengiamiesiems bandymams.

Palaukę bent 5 min, iš pradinės suspensijos ruoškite bandomąsias suspensijas.

#### 9.1.2. Bandymo suspensijos

Į 500  $\mu\text{l}$  tirpalo (5.5), įpildo į kiuvetes, laikomas esant  $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  (Microtox 500 analizatorius), įpilkite pradinės suspensijos 10  $\mu\text{l}$  alikvotines dalis tokiais laiko tarpais, kokiais tai darysite vėliau matuodami intensyvumą. Mišinius maišykite, purtydami ranka.

#### 9.2. Bandymo eiga

Bandymo eiga pagal Microtox<sup>R</sup> toksiškumo testavimo sistemos (Microtox 500 analizatorius) programą – Software MicrotoxOmni<sup>TM</sup> for Windows 95/98/NT, naudojant procedūrą ( $G_{L2} - G_{L32}$ ).

Rekomenduojama, kad dirbant su nežinomais mėginiais, įprastai, būtų imami 5 ir 15 minučių (o gal ir 30 min) duomenys. Taikant Microtox<sup>R</sup> toksiškumo testavimo sistemos (Microtox 500 analizatorius), procedūrą ( $G_{L2} - G_{L32}$ ) imami 30 min. duomenys.

Programinė įranga gali automatiškai apdoroti duomenis, gaunamus, jei Jus esate pasirinkę, tiek iš vieno, tiek dviejų, tiek trijų laiko taškų.

Kiekvienam testui būtina Reagento kontrolė ir atliekama lygiagrečiai su testu. Šviesos lygis, normaliai, laikui bėgant kinta dėl kitų priežasčių, negu mėginio bioreaktyvumas.

Reagento kontrolės naudojimas leidžia dirbančiajam kompensuoti kai kuriuos iš tų kintamų dydžių, kurie sumažina duomenis.

Visuose Pagrindinio testo procedūrų variantuose, visų testo kiuvečių atsakai yra normalizuojami kontrolinio testo atsako atžvilgiu, ir tai kompensuoja paklaidas iki 20 %, kurios gaunamos pipete įpilant 10  $\mu\text{l}$  Reagento.

### 10 Įvertinimas

PASTABA. Naudojama programinė įranga visus duomenis apdoroja automatiškai

#### 10.1 Slopinamasis poveikis švytinčiosioms bakterijoms

Pagal išmatuotą švytėjimo intensyvumą apskaičiuokite pataisos faktorių ( $f_{kt}$  vertę), taikydami 1 lygtį. Šis faktorius skirtas visoms bandomųjų ėminių pradinėms  $I_0$  vertėms pataisyti prieš tai, kaip jas būtų galima naudoti kaip etalonines vertes nuo vandens priklausančiam švytėjimo sumažėjimui nustatyti.

$$f_{kt} = I_{kt}/I_0 \quad (t = 5\text{ min}, 15\text{ min}, 30\text{ min}) \quad (1)$$

$f_{kt}$  – pataisos faktorius sąveikos trukmei 5 min, 15 min arba 30 min;

$I_{kt}$  – kontrolinio ėminio švytėjimo intensyvumas po 15 min arba 30 min sąveikos, santykiniais švytėjimo vienetais;

$I_0$  – kontrolinio ėminio suspensijos švytėjimo intensyvumas prieš pat skiediklio (5.2) įpylimą, santykiniais švytėjimo vienetais.

Suvidurkinkite kontrolinių ėminių  $f_{kt}$  vertes.

Apskaičiuokite  $I_{ct}$ , taikydami 2 lygtį:

$$I_{ct} = I_0 \times \overline{f_{kt}} \quad \dots(2)$$

$\overline{f_{kt}}$  –  $f_{kt}$  vidutinė vertė;

$I_0$  (žr. 1 lygtį);

$I_{ct}$  – pataisytoji  $I_0$  vertė bandomojo ėminio kiuvetėms prieš pat bandomojo ėminio pridėjimą.

Apskaičiuokite bandomojo ėminio slopinamąjį poveikį, taikydami 3 lygtį:

$$H_t = I_{ct} - I_{Tt} / I_{ct} \times 100 \quad (3)$$

$H_t$  – bandomojo ėminio slopinamasis poveikis po 15 min arba 30 min sąveikos, %;

$I_{ct}$  – (žr. 2 lygtį);

$I_{Tt}$  – bandomojo ėminio švytėjimo intensyvumas po 15 min arba 30 min sąveikos, santykiniais švytėjimo vienetais.

Apskaičiuokite slopinamojo poveikio vidurkį  $H_t$  kiekvienam skiedimo laipsniui, %.

Apskaičiuokite lygiagrečiųjų  $H_t$  nustatymų nuokrypį nuo atitinkamo lygiagrečiųjų ėminių vidurkio ir kaip kontrolinių ėminių vidurkio procentinę dalį.

Koncentracijos ir poveikio santykiui įvertinti kiekvienam skiedimo laipsniui gaukite gamą vertę, taikydami 4 lygtį:

$$\frac{\Gamma_t}{H_t} = \frac{H_t}{100 - H_t} \quad (4)$$

– bandomojo ėminio gama vertė po 15 min arba 30 min sąveikos;  
 –  $H_t$  vidurkis (žr. 3 lygtį).

**PASTABA** Kai tam tikroms bandomosioms koncentracijoms gaunamos 0 % arba 100 % biologinio švytėjimo vertės, gama vertė negali būti apskaičiuota. Taigi koncentracijos ir poveikio santykiui apskaičiuoti paprastai naudojamos tik 10 % - 90 % intervalo  $H_t$  vertės.

#### 10.2 EC verčių nustatymas

Apskaičiuokite koncentracijos ir poveikio santykį kiekvienai sąveikos trukmei, taikydami standartinę tiesinės regresijos analizę. Koncentracijos ir poveikio santykis esant tam tikrai sąveikos trukmei dažnai gali būti aprašytas šia tiesės lygtimi 5:

$$\lg c_t = b \times \lg \Gamma_t + \lg a \quad \dots(5)$$

$\Gamma_t$  – [žr. 4 lygtį];  
 $b$  – aprašytosios tiesės krypties koeficiento vertė;  
 $\lg a$  – aprašytosios tiesės atkarpos ordinačių ašyje vertė.

Taikydami standartinę mažiausių kvadratų statistiką, apskaičiuokite  $EC_{20}$  ir  $EC_{50}$  vertes, esant atitinkamiems pasiklovimo režiams, pagal kurią:

$$c_t = EC_{20,t}, \text{ kai } \Gamma_t = 0,25;$$

$$c_t = EC_{50,t}, \text{ kai } \Gamma_t = 1,00.$$

Jei verčių porų intervalo negalima aproksimuoti tiesė, EC vertės gali būti įvertintos grafiškai, naudojant dvigubą logaritminę koordinatinių sistemą.

#### **11 Tinkamumo kriterijai**

Bandytas yra tinkamas, jei

- $f_{kt}$  vertė yra 0,6 - 1,8 intervale, esant 30 min inkubavimo trukmei;
- lygiagrečiųjų nustatymų nuokrypis nuo vidutinės vertės yra ne didesnis kaip 3 %. Tai galioja kontroliniams ir bandomiesiems ėminiams, kurie naudojami LID vertei arba  $EC_{20}/EC_{50}$  vertėms nustatyti;
- trys etaloninės medžiagos (5.6) po 30 min sąveikos sukelia 20 % - 80 % slopinimą, esant šioms koncentracijos vertėms (tirpalai ne neutralizuoti, tikrinkite atskirai):

3,4 mg/l	3,5-dichlorfenolis
2,2 mg/l $Zn^{2+}$	(kaip cinko sulfato heptahidratas)
18,7 mg/l $Cr^{6+}$	(kaip kalio dichromatas).