



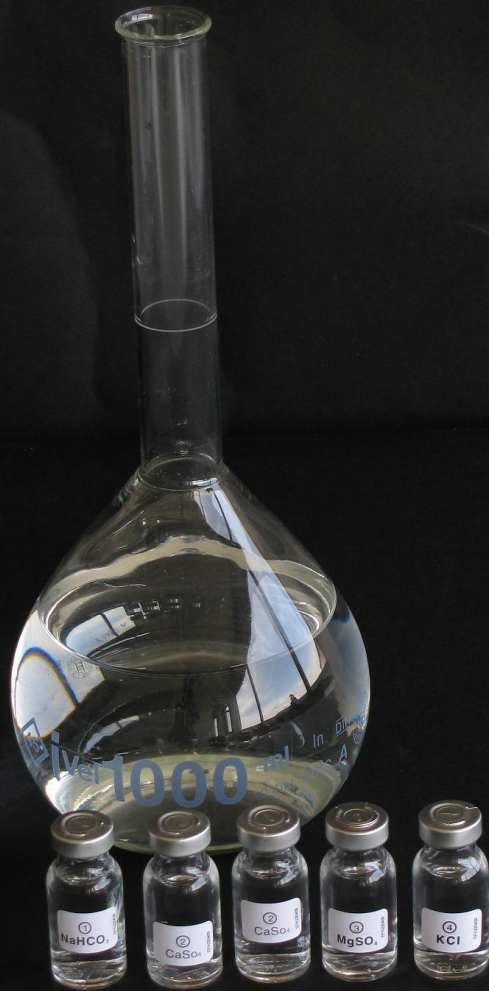
# ROTOXKIT F CHRONIC

## Procedura testu

# 1

## PRZYGOTOWANIE STANDARDOWEJ POŻYWKI

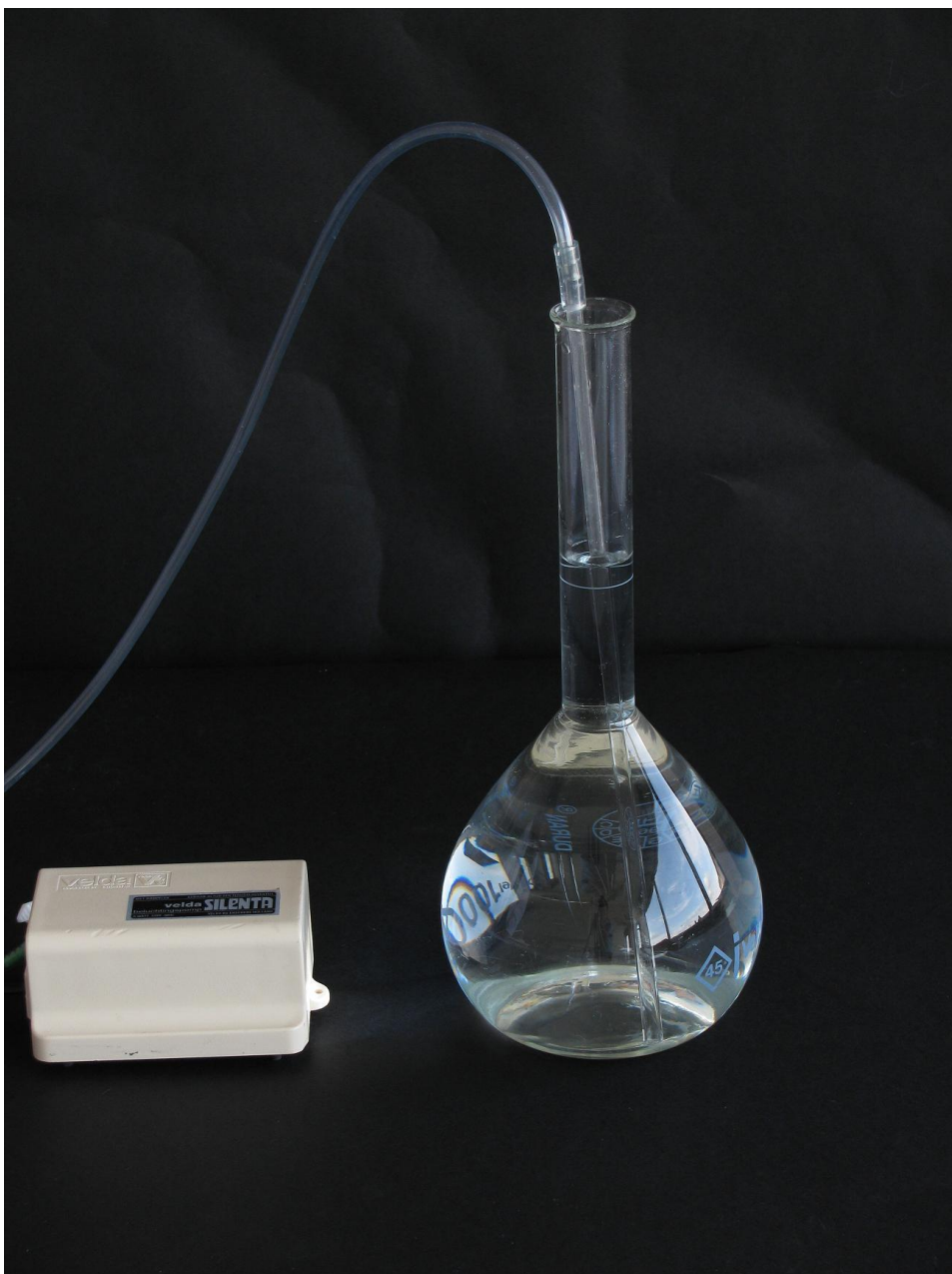
- KOLBKA MIAROWA (1 litr)
- FIOŁKI Z ROZTWORAMI  
SKONCENTROWANYCH SOLI
- DESTYLOWANA  
(lub dejonizowana) WODA





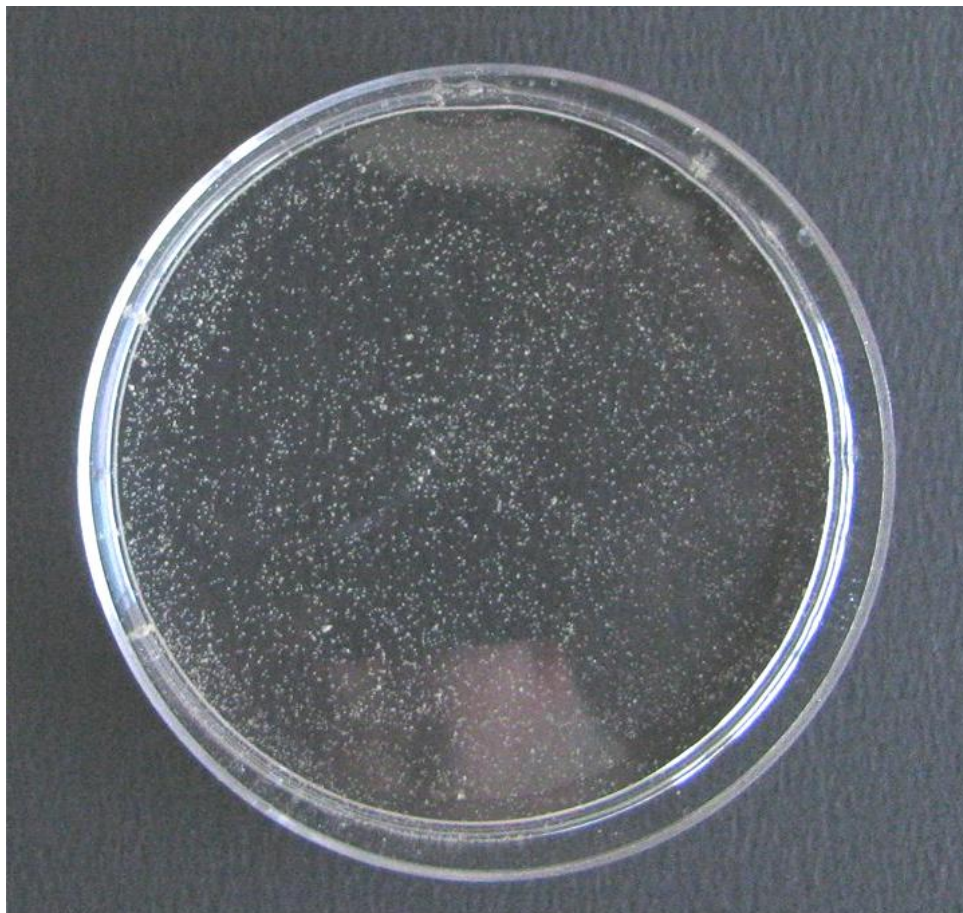
2

PRZELAĆ ZAWARTOŚĆ 5 FIOLEK  
ZE SKONCENTROWANYMI  
ROZTWORAMI SOLI  
DO  $\pm$  800 ML WODY DESTYLOWANEJ,  
W KOLBCE MIAROWEJ 1 LITR



**3**

- NAPEŁNIĆ KOLBKĘ DO LINII ZNAKOWEJ  
1 LITR
- NAPOWIETRZAĆ PRZEZ  
CO NAJMNIJ 15 MINUT



**4**

**WYLĘG WROTKÓW**

WYLĘG Z CYST POWINIEN BYĆ NASTAWIONY 16-18 GODZIN PRZED  
ROZPOCZĘCIEM TESTU TOKSYCZNOŚCI



**5**

PODAĆ 9 ML STANDARDOWEJ  
POŻYWKI NA 5 CM PŁYTKĘ  
PETRI'EGO



6

OPRÓŻNIĆ FIOŁKĘ Z CYST NA  
PŁYTKĘ PETRI'EGO. UPEWNIĆ SIĘ,  
ŻE WYSZYSTKIE CYSTY ZOSTAŁY  
PRZENIESIONE



7

ABY UPEWNIĆ SIĘ, ŻE WYSZYSTKIE CYSTY ZOSTAŁY PRZENIESIONE, WYPŁUKAĆ FIOŁKĘ  
DWUKROTNIE, UŻYWAJĄC 2 X 0,5 ML STANDARDOWEJ POŻYWKI





# 8

## INKUBACJA CYST

INKUBOWAĆ PŁYTKĘ PETRI'EGO  
PRZEZ 16-18 GODZIN, W 25 °C  
PRZY CIĄGŁYM OSWIETLENIU  
MIN. 3 000 – 4 000 LUX

\* Czas wylęgu może się nieznacznie różnić pomiędzy kolejnymi partiami cyst. Należy zapoznać się z kartą specyfikacji.



# 9

## KARMIEŃIE MŁODYCH ORGANIZMÓW

Wrotki, zaraz po wylęgu muszą być karmione przez 2 godziny, specjalnym pokarmem (RotiRich), przed rozpoczęciem testu toksyczności

DO JEDNEJ FIOŁKI Z POKARMEM ROTIRICH  
DODAC 1 ML STANDARDOWEJ POŻYWKI

# 10



ZATKAĆ PROBÓWKĘ I DOKŁADNIE  
WYMIESZAĆ ZAWARTOŚĆ W CELU  
UZYSKANIA JEDNORODNEJ ZAWIESINY  
POKARMU



11

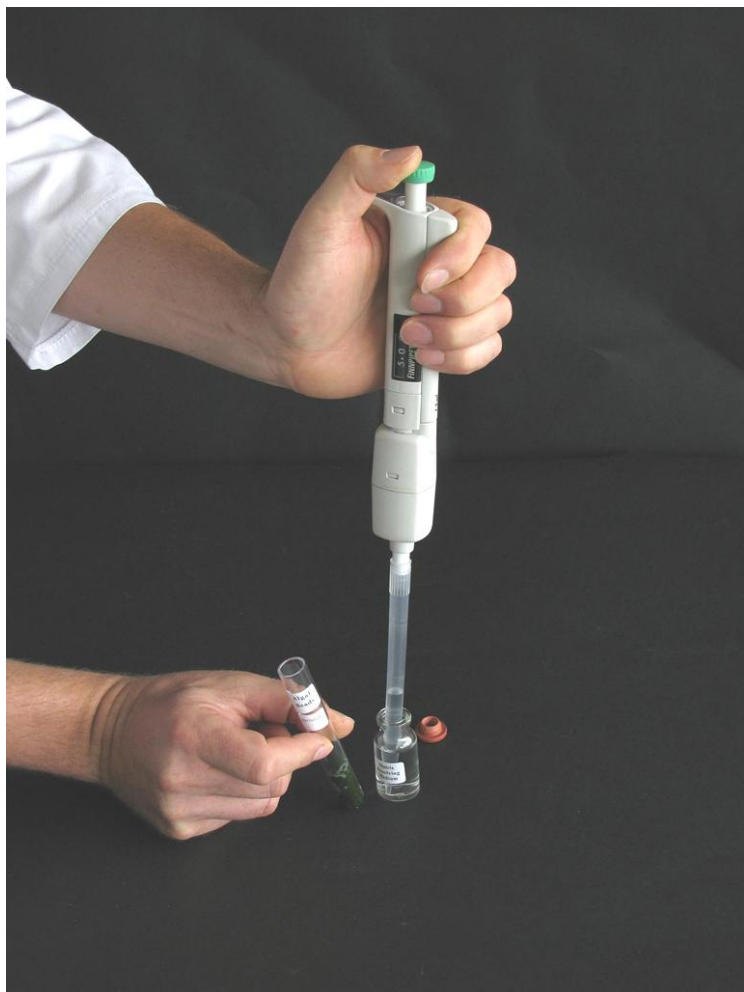
- POBRAĆ MIKROPIETĄ MAŁĄ PORCJĘ ZAWIESINY POKARMU ROTIRICH
- PODAĆ 5 KROPLI NA PŁYTKĘ PETRI'EGO Z MŁODYMI WROTKAMI
- ZAMIESZAĆ DELIKATNIE PŁYTKĄ
- UMOZLIWIĆ WROTKOM KARMIENIE PRZEZ DWIE GODZINY PRZED ROZPOCZĘCIEM TESTU



# 12

## PRZYGOTOWANIE ZAWIESINY POKARMU Z GLONÓW

Z JEDNEJ PROBÓWKI ZE ZŁOŻAMI GLONÓW WYLAĆ POŻYWKĘ DO PRZECHOWYWANIA,  
UWAŻAJĄC, ABY NIE UTRACIĆ JAKIEGOKOLWIEK ZŁOŻA PRZY TEJ OPERACJI



# 13

## UWALNIANIE GLONÓW

DODACĆ 4 ML ROZTWORU UWALNIAJĄCEGO GLONY DO PROBÓWKI ZE ZŁOŻAMI GLONÓW  
I ZAMKNAĆ JĄ KORKIEM



14

WSTRZĄSAĆ PROBÓWKĘ NA VORTEX-IE, AŻ ZŁOŻA ZOSTANĄ CAŁKOWICIE  
ROZPUSZCZONE I GLONY ZOSTANĄ UWOLNIONE



15

WIROWAĆ PROBÓWKĘ PRZEZ 10 MINUT PRZY 3000 OBR/MIN W STANDARDOWEJ WIRÓWCE LABORATORYJNEJ





**16**

OSTROŻNIE WYLAĆ SUPERNATANT Z PROBÓWKI



DODACĆ 10 ML WODY DESTYLOWANEJ  
DO PROBÓWKI Z PELETKĄ GLONÓW

17



ZATKAĆ I WSTRZĄSAĆ PROBÓWKĘ,  
AŻ DO UZYSKANIA JEDNORODNEJ  
ZAWIESINY GLONÓW



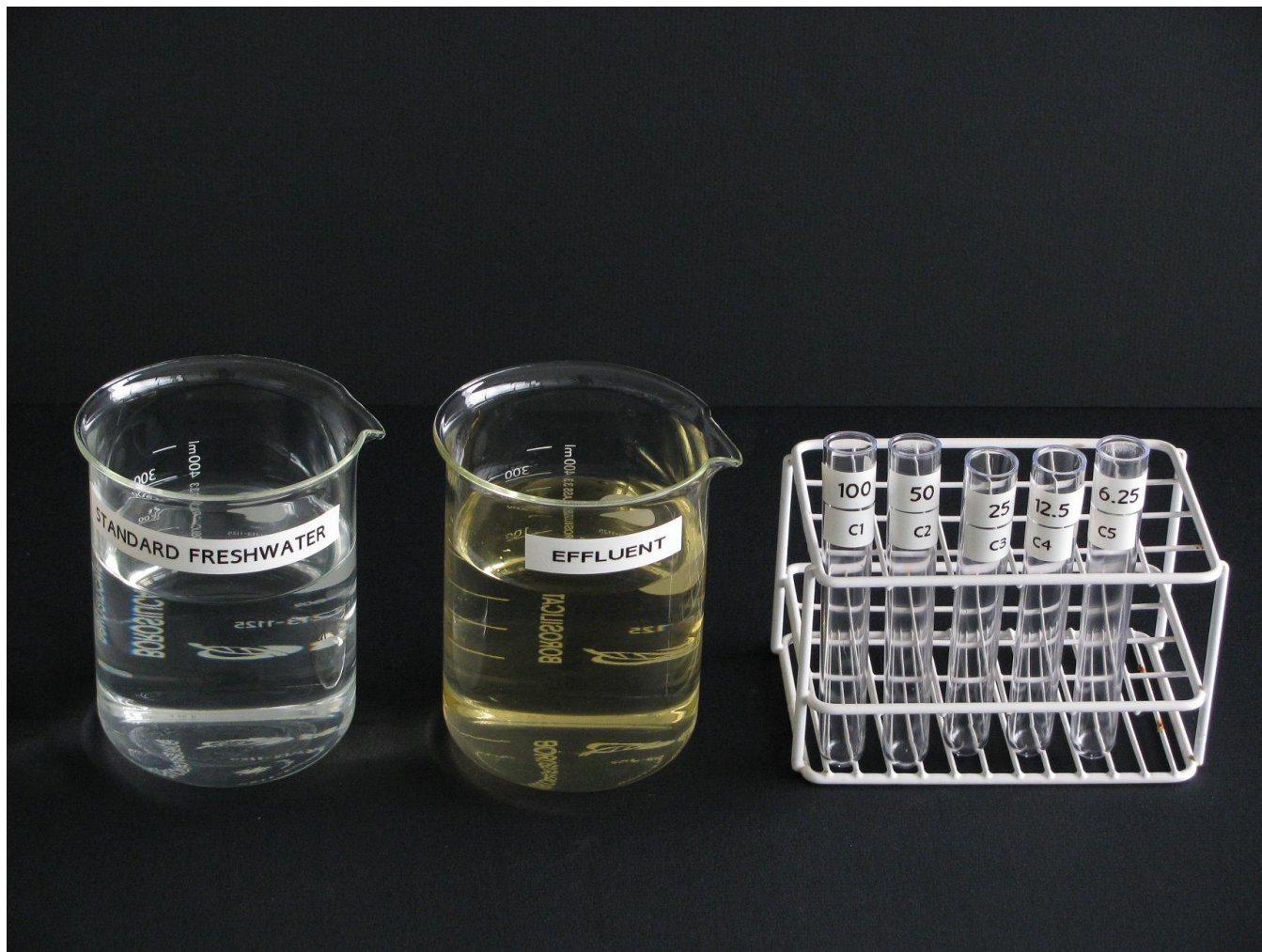
# 18

WIROWAĆ PROBÓWKĘ PONOWNIE 3000 OBR/MIN PRZEZ 10 MINUT  
I WYLAĆ SUPERNATANT



# 19

- DODACЬ 1,8 ML STANDARDOWEJ POŻYWKI DO PROBÓWKI Z PELETKĄ GLONÓW
- ZATKAĆ PROBÓWKĘ I WSTRZAŚAĆ DOKŁADNIE, AŻ DO UZYSKANIA JEDNORODNEJ ZAWIESINY GLONÓW



# 12

**PRZYGOTOWANIE ROZCIEŃCZEŃ TOKSYCZNEJ SUBSTANCJI**

n.p. PRÓBKA ŚCIEKÓW

# 21

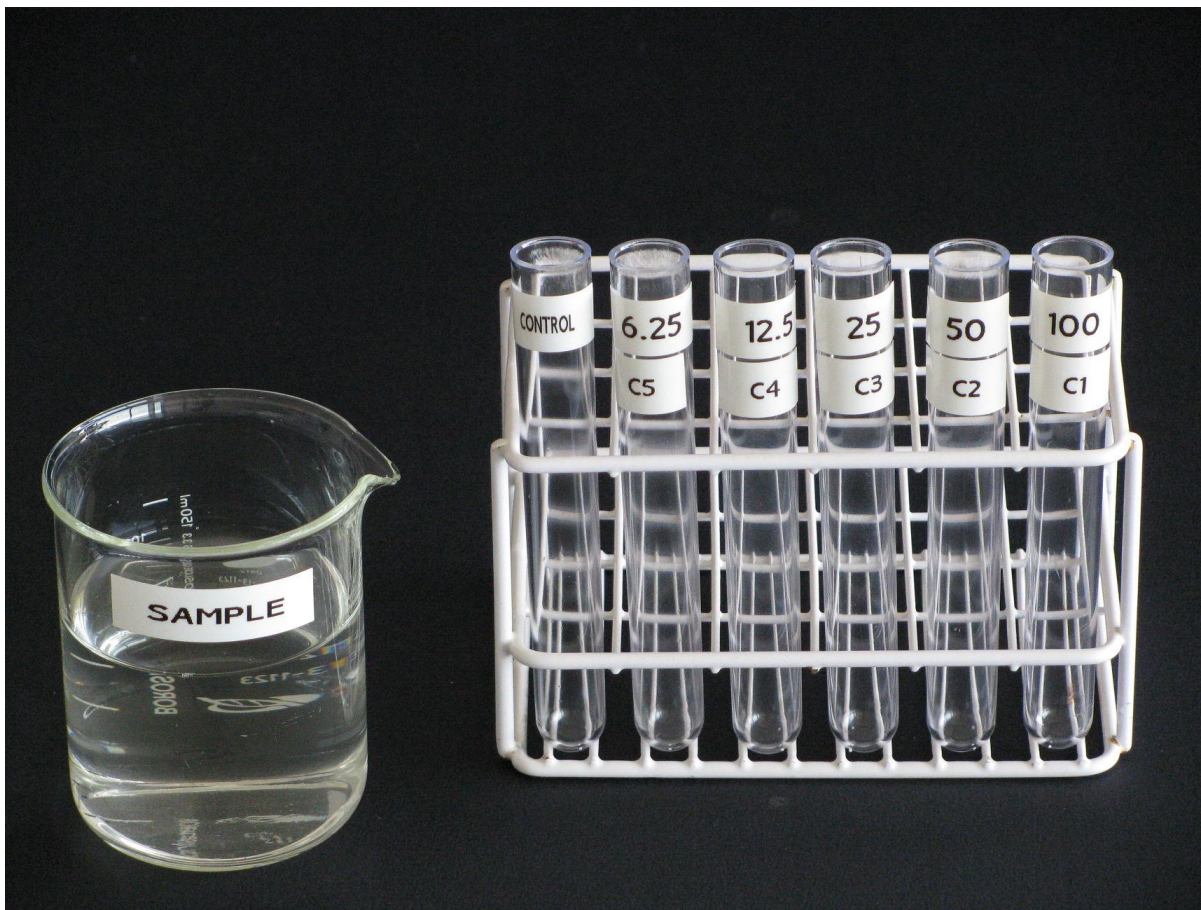
## 1. PRZYGOTOWANIE PRÓBK

W celu uniknięcia wpływu zawiesiny i/lub organizmów, które mogą być obecne w próbce ścieków, zaleca się oczyszczenie próbki przed rozpoczęciem testu.

Preferuje się odwirowanie z użyciem supernatantu do testów.

Alternatywnie, można wykonać filtrację na filtrze szklanym o niskiej porowatości.



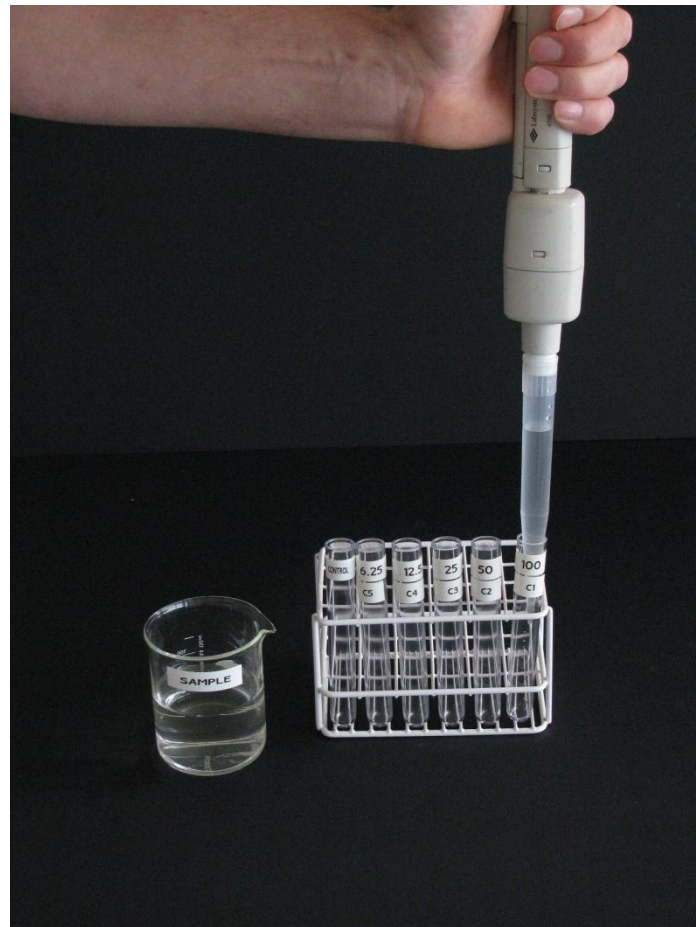


## 22

### 2. PRZYGOTOWANIE ROCIEŃCZEŃ SUBSTANCJI TOKSYCZNEJ

(100% - 50% - 25% - 12,5% - 6,25% ścieków)

PRZYGOTOWAĆ SZEŚĆ 20 ML PROBÓWEK TESTOWYCH I OZNAKOWAĆ JE  
OD C1 DO C5 I KONTROLA



**23**

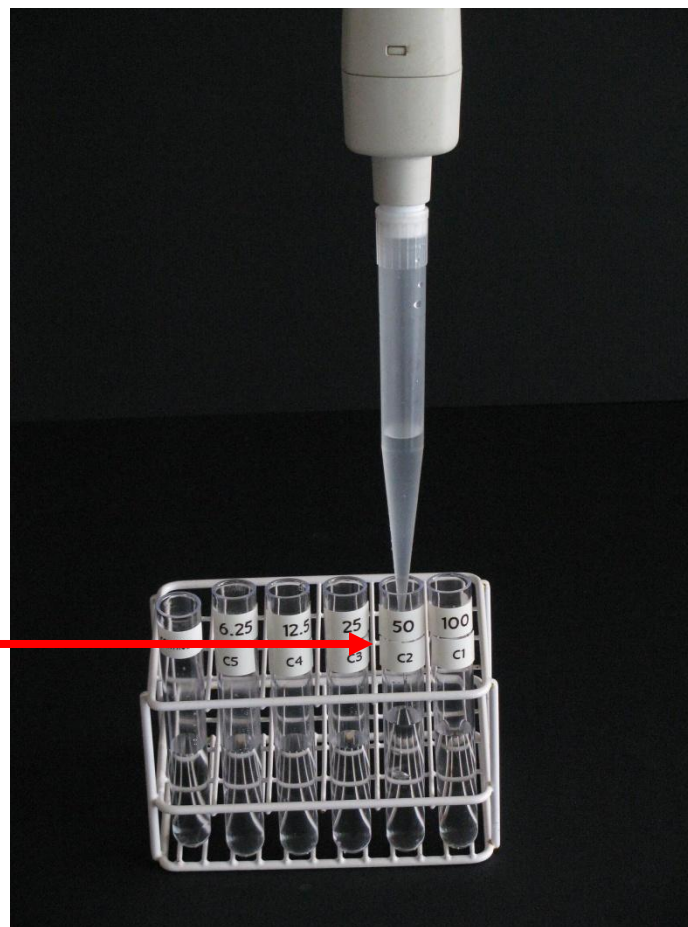
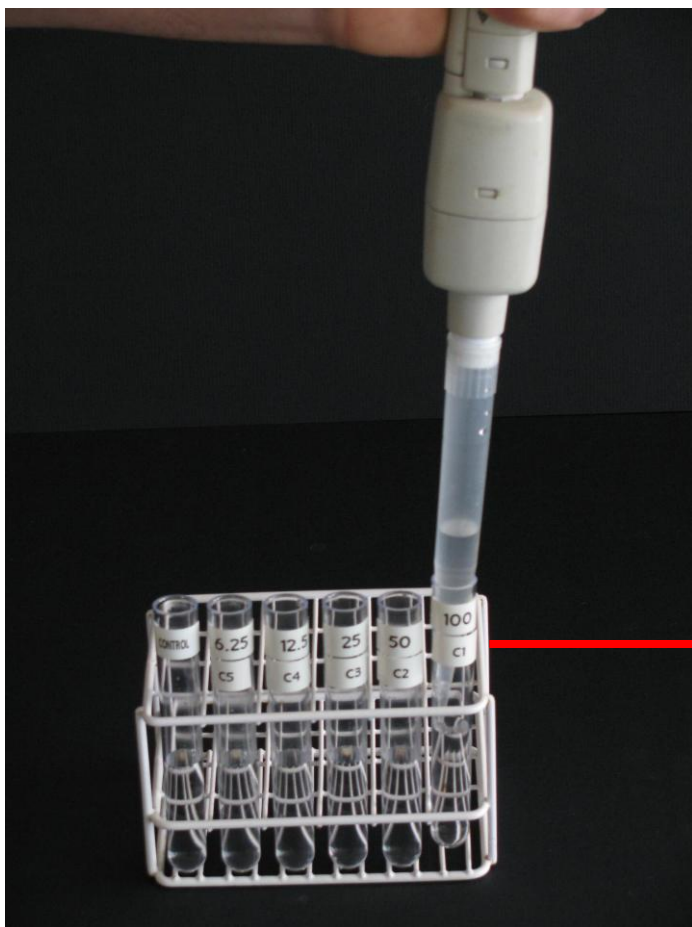
UMIEŚCIĆ 20 ML PRÓBKĘ W PROBÓWCE C1 (= 100% ścieków)





24

PODAĆ 10 ML STANDARDOWEJ POŻYWKI DO PROBÓWKI KONTROLNEJ  
I PROBÓWEK C5 DO C2



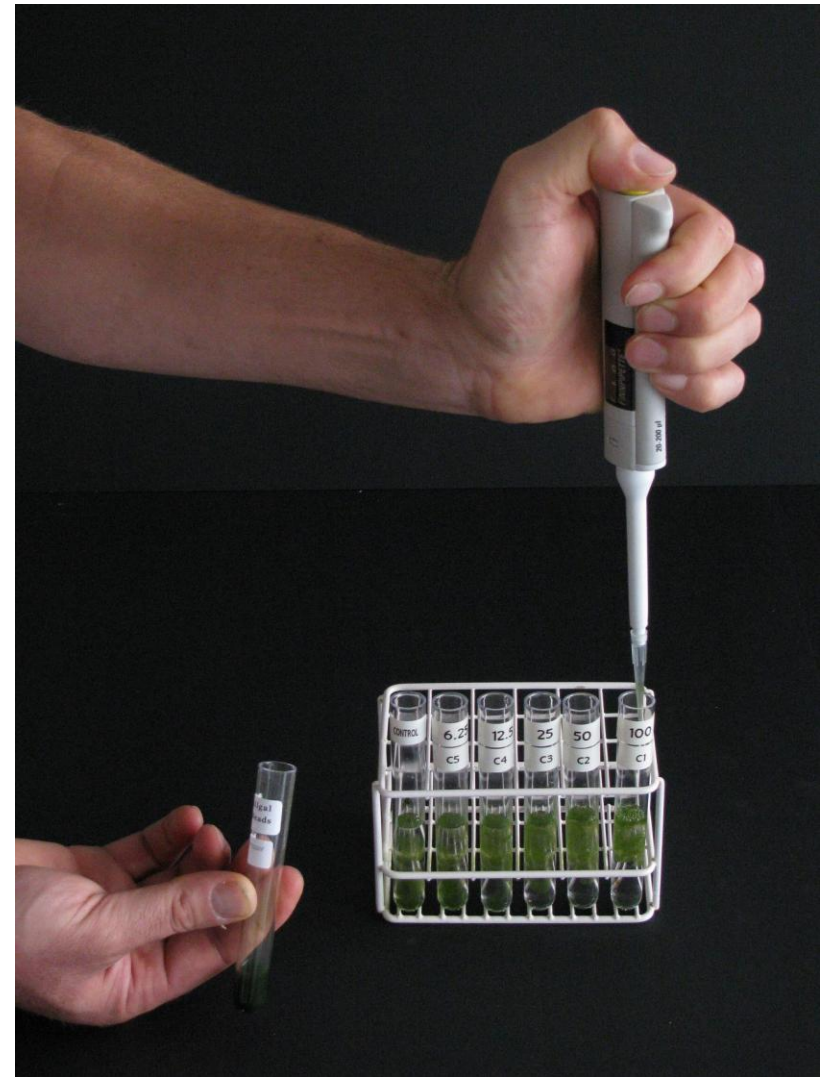
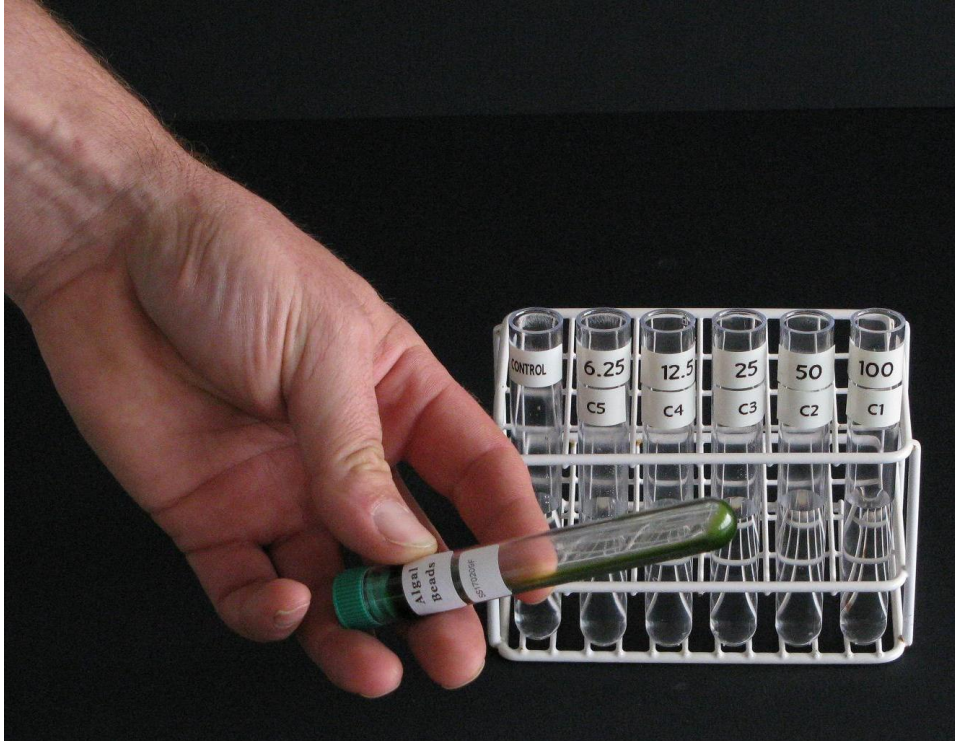
25

- PRZENIEŚĆ 10 ML PRÓBKĘ Z C1 DO C2 I WYMIESZAĆ (= 50% ścieków)
- POWTARZAĆ PRZENIESIENIE 10 ML Z C2 DO C3 (= 25% ścieków),  
C3 DO C4 (= 12.5% ścieków) I C4 DO C5 (= 6.25% ścieków)



**26**

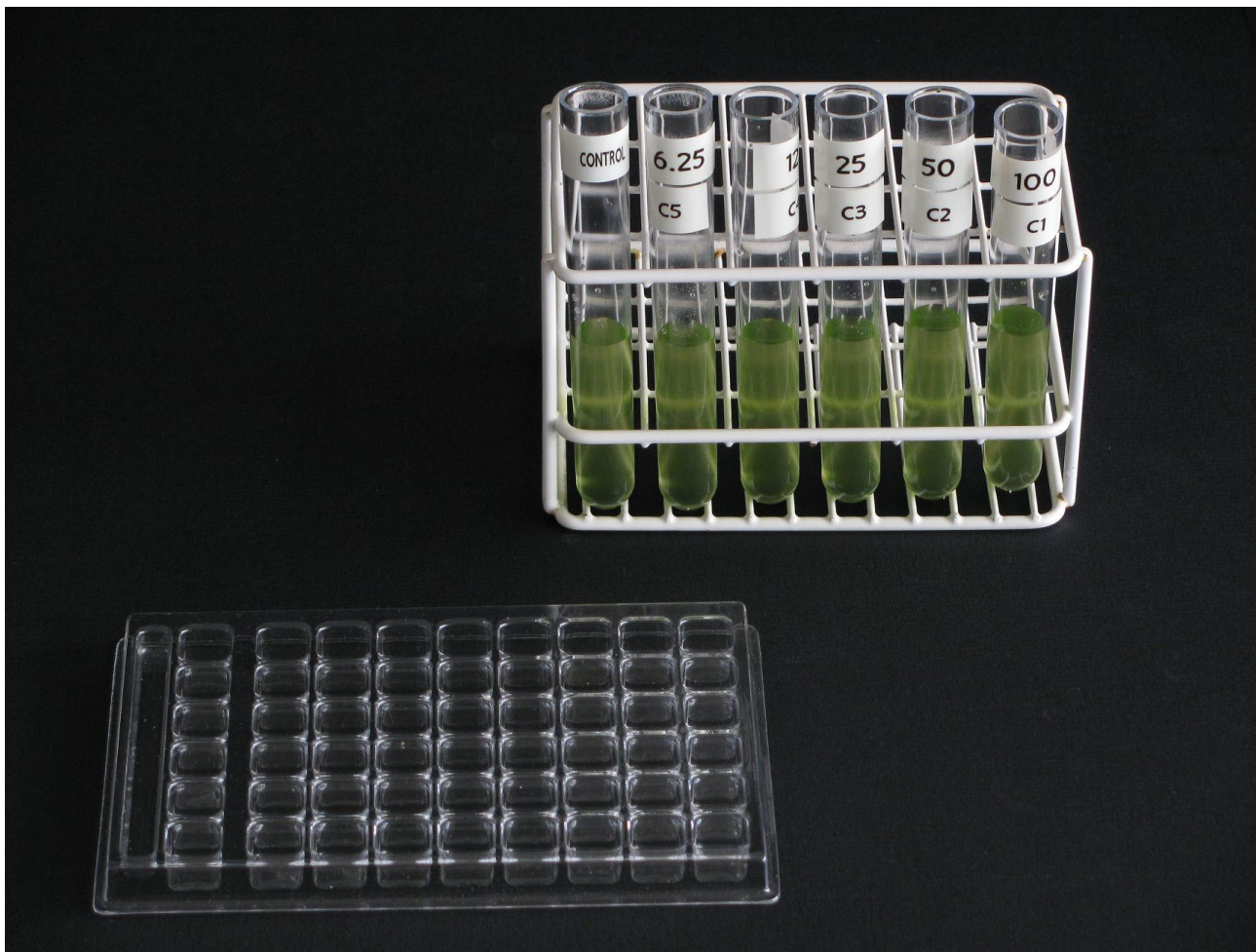
ODRZUCIĆ 10 ML Z PROBÓWKI C5



27

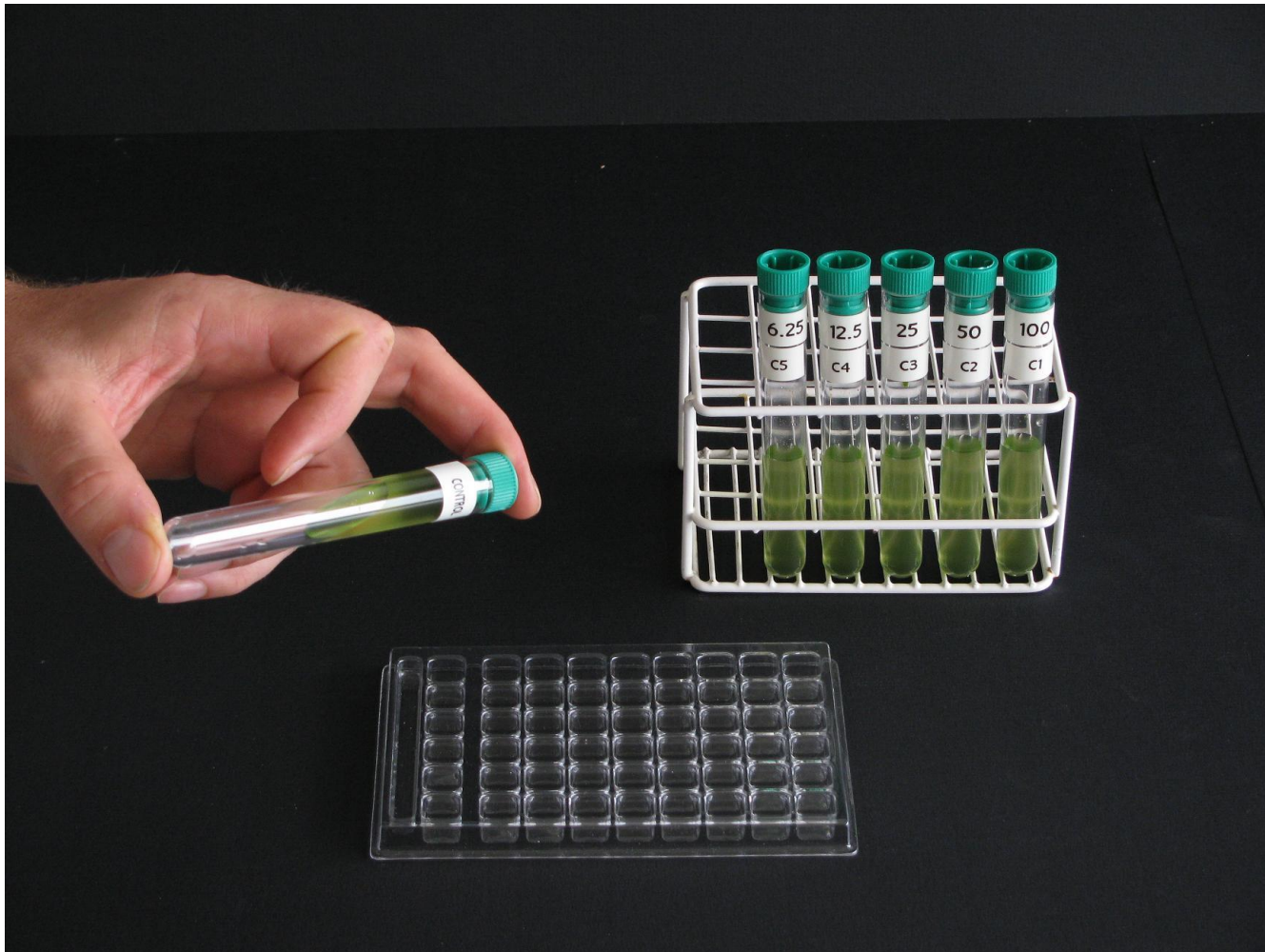
3. DODAWANIE POKARMU Z GLONÓW DO ROZCIEŃCZEŃ SUBSTANCJI TOKSYCZNEJ I KONTROLI

- WSTRZĄSNAĆ DOKŁADNIE PROBÓWKĘ ZE SKONCENTROWANYM POKARMEM Z GLONÓW
- DODAC 100 µl DO WSZYSTKICH PROBÓWEK



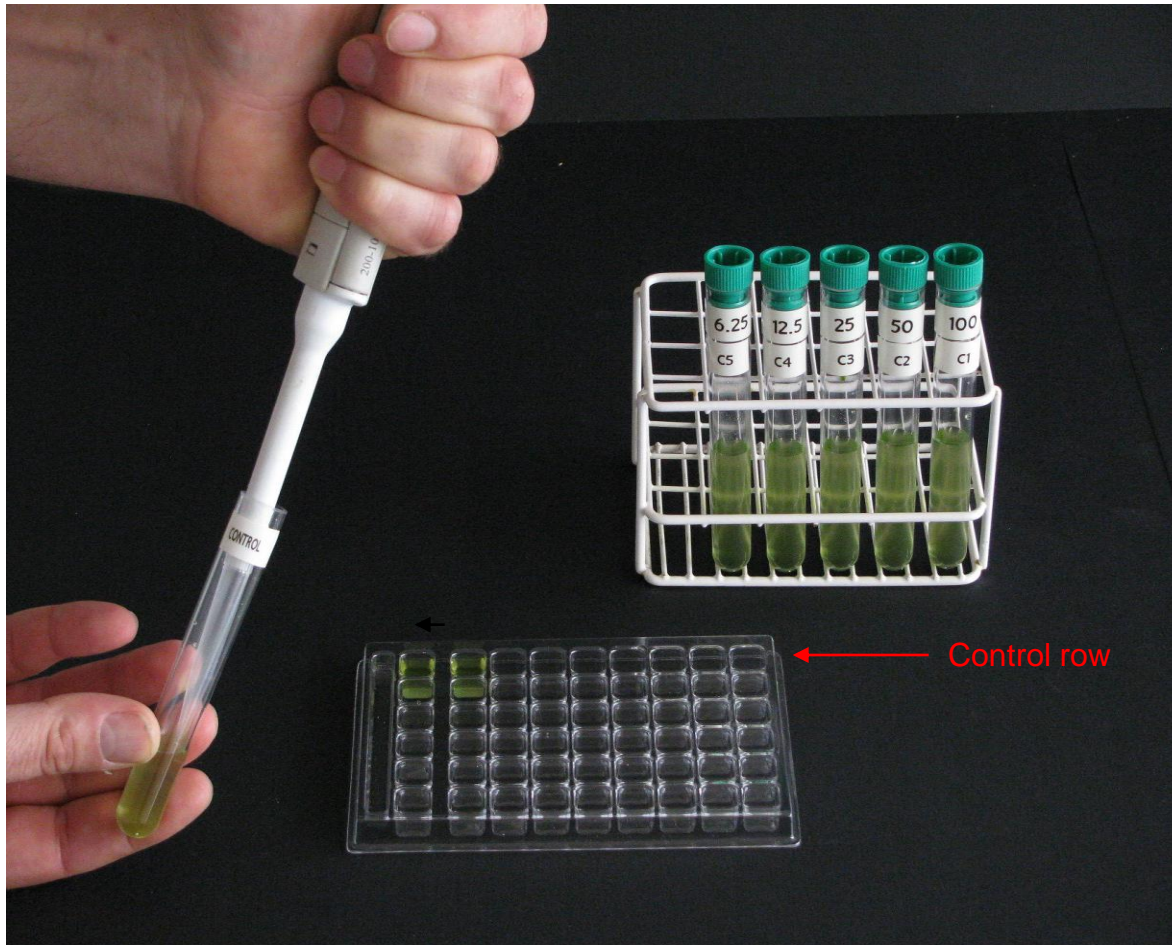
**28**

**NAPEŁNIANIE PŁYTKI TESTOWEJ**



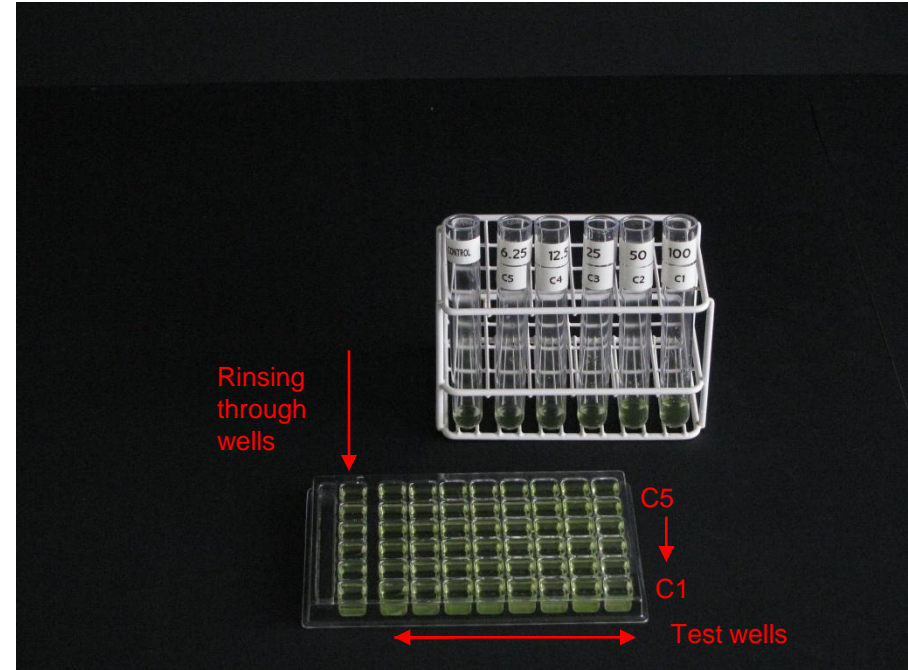
**29**

WSTRZĄSNAĆ PROBÓWKĄ Z KONTROLĄ



**30**

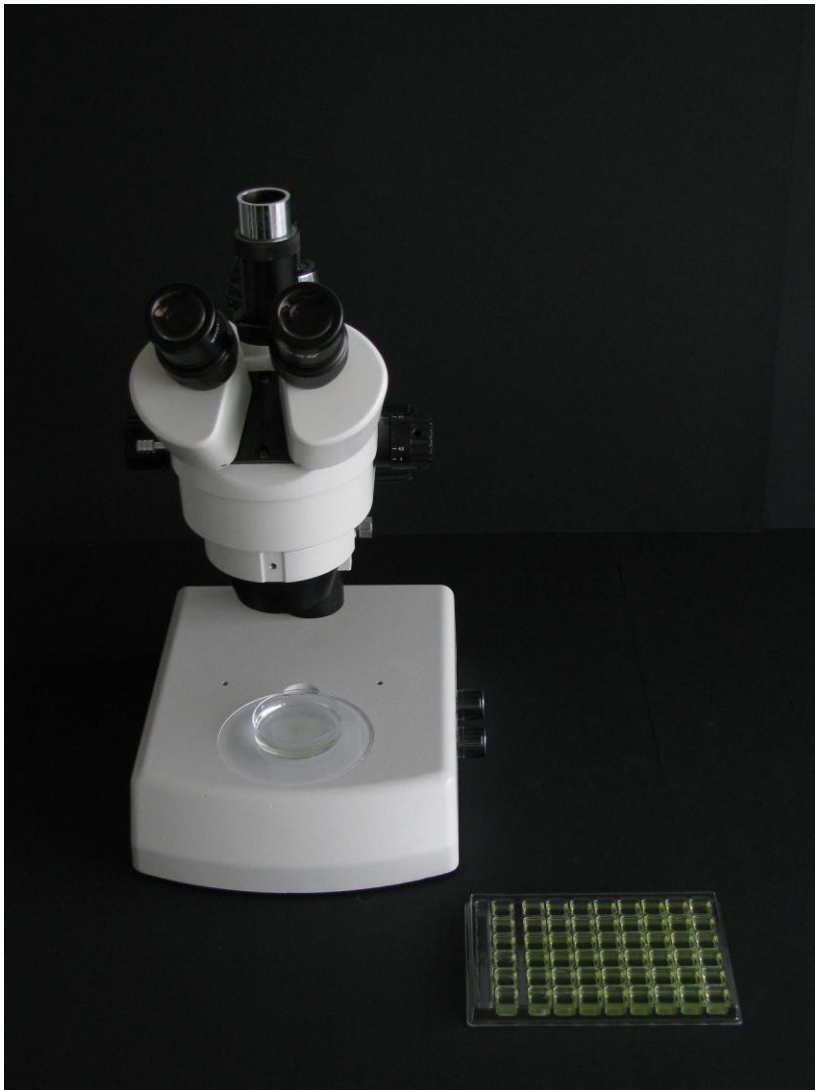
PRZENIEŚĆ 1ML DO KAŻDEGO DOŁKA W RZĘDZIE KONTROLI



# 31

- WSTRZĄSNAĆ PROBÓWKI Z SUBSTANCJĄ TOKSYCZNĄ
- PRZENIEŚĆ 1 ML KAŻDEGO STĘŻENIA DO DOŁKA DO PŁUKANIA I DO 8 DOŁKÓW W KAŻDYM RZĘDZIE,
- PROWADZIĆ PRZENOSZENIE W KOLEJNOŚCI WZRATAJĄCYCH STĘŻEŃ, (t.j. od góry rzędu do dołu w płytce wielodołkowej, a więc od C5 do C1)





# 32

## **PRZENOSZENIE WROTEK DO DOŁKÓW TESTOWYCH**

Ze względu na małe rozmiary organizmów, przenoszenie wrotek do dołek testowych musi być prowadzone pod mikroskopem o powiększeniu 10-12 X



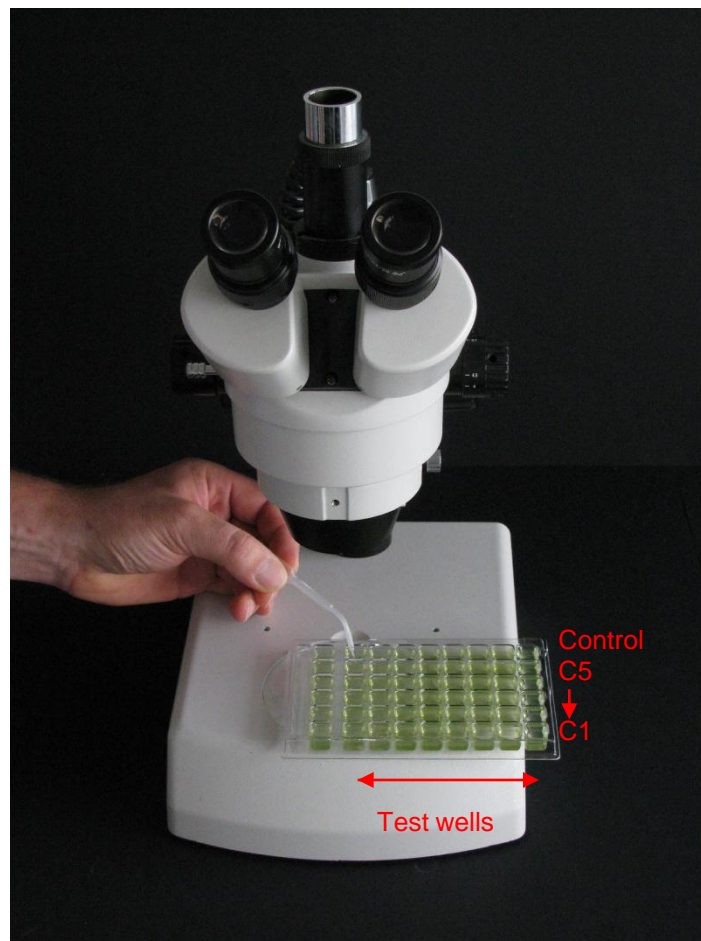
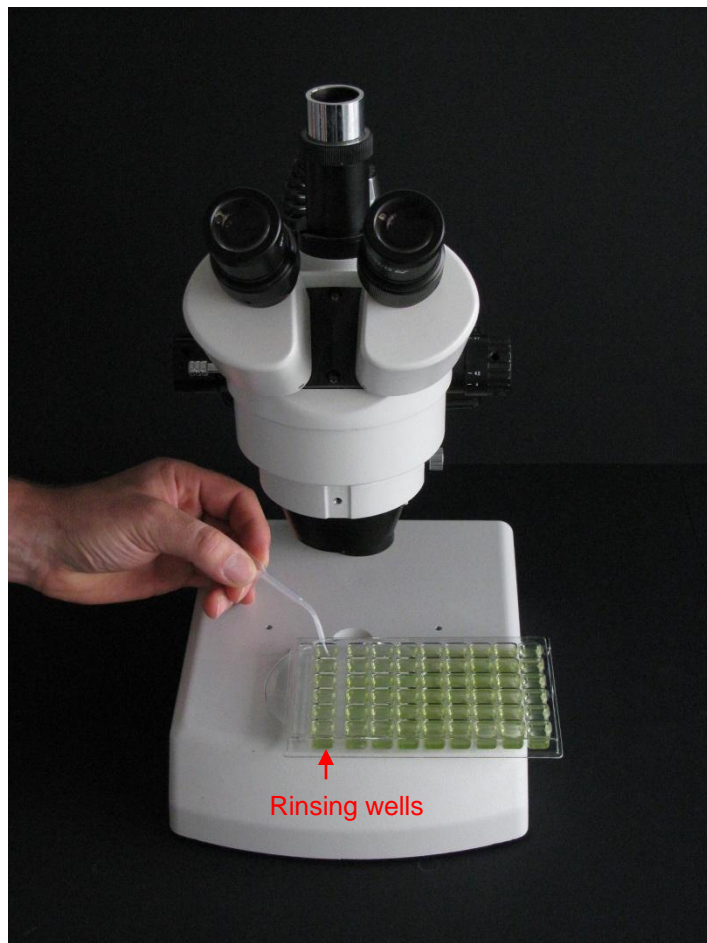
## 33

- UMIEŚCIĆ PŁYTKĘ PETRI'EGO Z MŁODYMI I NAKARMIONYMI ORGANIZMAMI NA STOLIKU MIKROSKOPU
- POBRAĆ KILKANAŚCIE ORGANIZMÓW PLASTIKOWĄ MIKROPIPETĄ, ŚCISKAJĄC JĄ U GÓRY ABY UZYSKAĆ EFEKT ZASYSANIA



# 34

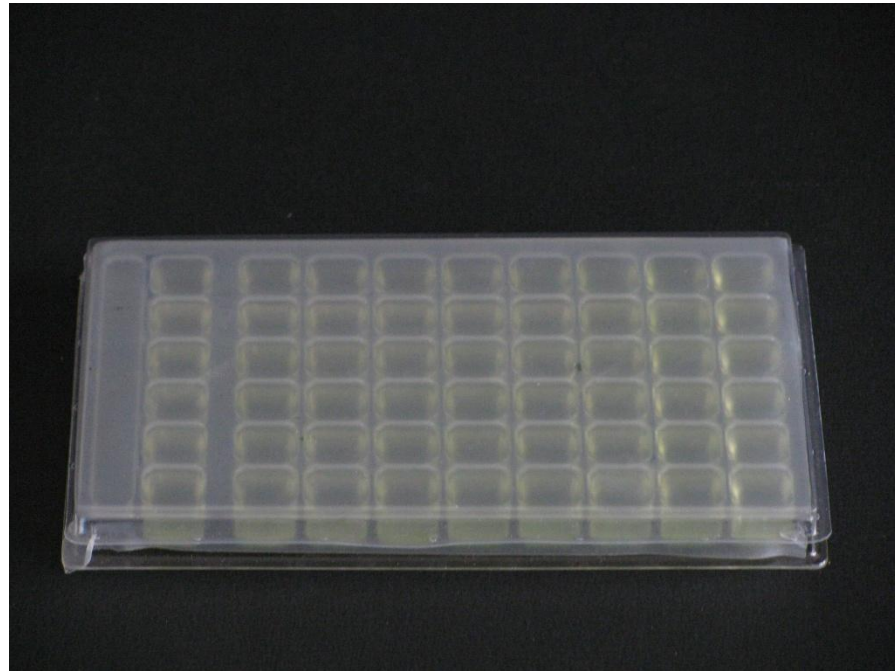
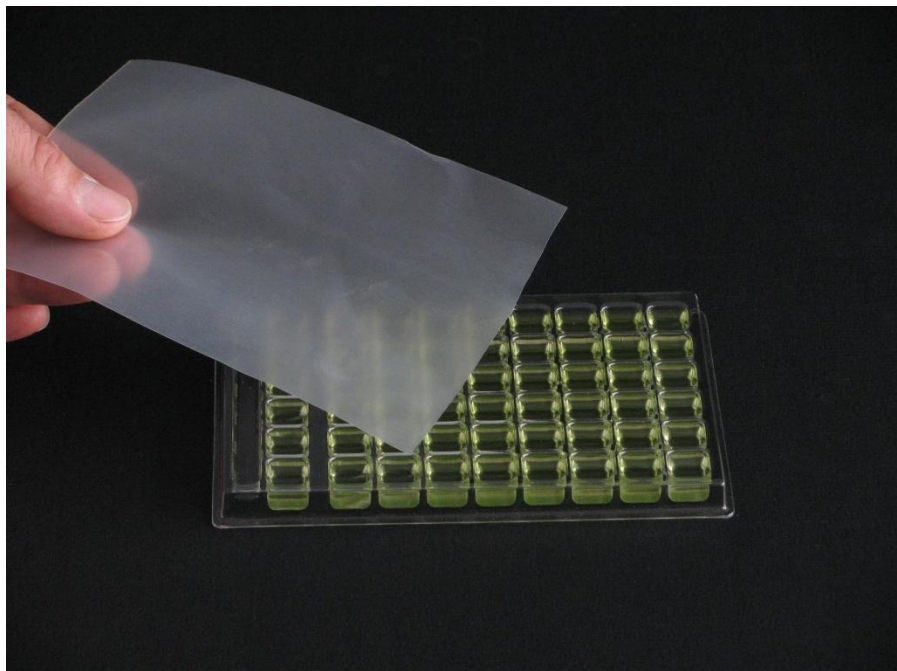
PRZENIEŚĆ 10-15 WROTKÓW Z PŁYTKI PETRI'EGO DO DOŁKÓW DO PŁUKANIA  
W NASTĘPUJĄCEJ KOLEJNOŚCI: RZĄD X (Kontrola), RZĄD C5 – C4 – C3 – C2 – C1  
(od góry do dołu płytki wielodołkowej, w ciągu wzrastających stężeń)



35

PRZENIEŚĆ PO **JEDNYM** WROTKU Z DOŁKA DO PŁUKANIA DO KAŻDEGO DOŁKA TESTOWEGO W TYM SAMYM RZĘDZIE

To przenoszenie powinno być także prowadzone w kolejności wzrastających stężeń (t.j. najpierw rząd kontroli i odpowiednio od rzędu C5 do C1)



**36**

PRZYKRYĆ PŁYTKĘ PASKIEM PARAFILMU I POŁOŻYĆ POKRYWKĘ



**37**

UMIEŚCIĆ PŁYTKĘ W INKUBATORZE W  
25 °C, W CIEMNOŚCI, PRZEZ 48 GODZIN

