

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

VÝZNAM ŘASOVÝCH TESTŮ V HODNOCENÍ EKOTOXICITY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

PETR CHOVANEC

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VÝZNAM ŘASOVÝCH TESTŮ V HODNOCENÍ EKOTOXICITY

THE IMPORTANCE OF ALGAL TESTS FOR ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

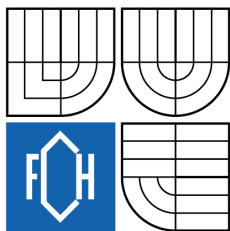
PETR CHOVANEC

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. HELENA DOLEŽALOVÁ
WEISSMANNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0288/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Petr Chovanec**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)
Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.**
Konzultanti bakalářské práce:

Název bakalářské práce:

Význam řasových testů v hodnocení ekotoxicity

Zadání bakalářské práce:

Studium řasových testů, jejich aplikace v hodnocení ekotoxicity

Termín odevzdání bakalářské práce: 29.5.2009

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Petr Chovanec
Student(ka)

Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium řasových testů. V rámci práce byla provedena rešerše shrnující poznatky o veškerých způsobech testování ekotoxicity na řasách. Práce se zabývá stručným popisem řas, jakožto testovacími organismy a jejich využití v testování ekotoxicity.

ABSTRACT

This bachelor thesis is aimed at the study of algal tests. Within the frame of this thesis I have performed a literature research into findings about all possibilities algal tests in ecotoxicity. This work is engaged in short description green algae, as a testing organisms and their usage for ecotoxicological evaluation.

KLÍČOVÁ SLOVA

řasové testy, ekotoxicita, chemické látky

KEYWORDS

algal tests, ecotoxicity, chemical agents

CHOVANEC, P. *Význam řasových testů v hodnocení ekotoxicity*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 33 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

*Děkuji Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové, Ph.D.
za pomoc a odborné vedení během psaní mé bakalářské práce*

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Ekotoxicita	8
2.2	Biologické testy toxicity (Biotesty).....	8
2.2.1	Makrobiotesty a klasické testy	9
2.2.2	Mikrobiotesty	10
2.2.3	Mikrobiotesty dle způsobu provedení	11
2.2.3.1	Test ve zkumavkách	11
2.2.3.2	Test v sérologických destičkách.....	12
2.2.3.3	Test v kyvetách.....	12
2.2.3.4	Biosenzor s imobilizovanými řasami	13
2.2.3.5	Varianta s agarem na Petriho miskách	14
2.2.4	Jednotlivé typy mikrobiotestů	14
2.2.4.1	Toxikity	14
2.2.4.2	Řasový mikrobiotest.....	14
2.2.4.3	Bakteriální testy toxicity	14
2.2.4.4	Alternativní biotesty s fluorescenčně značenými markery	14
2.2.5	Biosenzory nebo biofondy	15
2.3	Řasy.....	15
2.4	Řasové testy - teorie	16
2.4.1	Význam řasových testů	16
2.4.2	Dělení řasových testů dle typu řas.....	16
2.4.2.1	Řasové testy s mořskými řasami	16
2.4.2.2	Řasové testy se sladkovodními řasami.....	16
2.4.3	Dělení dle použité kultury	17
2.4.3.1	Jednodruhové	17
2.4.3.2	Multispecies test.....	17
2.4.4	Další dělení.....	17
2.4.4.1	Růstový biotest.....	17
2.4.4.2	Test barvením FDA.....	17
2.4.5	Vliv na řasové testy	17
2.4.5.1	Živné médium	17
2.4.5.2	Teplota.....	17
2.4.5.3	Osvětlení.....	18
2.4.5.4	Velikost inokula	18
2.5	Řasové testy – praxe.....	18
2.5.1	Charakteristika řasového testu	18
2.6	Řasový test – standardní.....	18
2.6.1	Testovací organismy	18
2.6.2	Princip	19
2.6.3	Živné média.....	21
2.6.4	Pomůcky.....	21
2.6.5	Postup.....	23
2.6.5.1	Příprava růstového média.....	23
2.6.6	Vyhodnocení testu.....	24

2.6.6.1	Řasová hustota.....	24
2.6.6.2	Potřebný objem inokula	25
2.6.6.3	Růstová rychlost.....	26
2.7	Řasový test - mikrobiotest.....	27
2.7.1	Princip	27
2.7.2	Postup.....	27
2.7.3	Měření hustoty řasové kultury.....	29
2.7.4	Testovací organismus.....	29
2.7.5	Živné médium a vzorek.....	29
2.7.6	Přístroje a pomůcky.....	29
3	Závěr.....	30
4	Seznam použitých zdrojů	31
5	Seznam použitých zkratk.....	33

1 ÚVOD

Moderní doba sebou přináší velký pokrok v technologických odvětvích, avšak ten je také spojen se vzrůstající mírou znečištění životního prostředí. Stejně jako rostliny, živočichové, tak i my jsme její nedílnou součástí, proto se stále snažíme zdokonalovat metody stanovení ekotoxických látek v složkách životního prostředí. Zatímco chemické analýzy vypovídají pouze o koncentraci a typu dostupných polutantů ve vzorku, ekotoxikologické biotesty nám podávají informace o přítomnosti polutantů pro živé organismy a jejich účinku na organismy. Řasové testy jsou v poslední době nedílnou součástí biotestů. A stejně jako ve většině současných odvětví se výzkum specializuje na snížení nákladů a náročnosti, platí to i pro řasové testy. Proto se v poslední době objevují mikrotesty, které budou v práci rozebrány a porovnány se standardními postupy.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ekotoxicita

Toxicita bývá definována jako jedovatý účinek znečišťující látky (polutantu), který potlačuje až zcela ničí život v ekosystémech.[1] Ekotoxicita je jednou ze základních charakteristik chemických látek, přípravků a odpadů. Hodnocení této vlastnosti je u nás, stejně jako v EU, dáno legislativně.[2]

2.2 Biologické testy toxicity (Biotesty)

Biotesty jsou používány pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek. V dnešní době se jako testovací organismy používá široká škála bakterií, sinic, řas, vyšších rostlin, perlooček, ryb, myši až po opice. Ačkoliv chemické analýzy látek, přípravků, odpadních vod, atmosférických srážek, výluhů a splachů poskytují důležité informace o jejich nebezpečných vlastnostech, nemohou dostatečně poskytnout údaje o toxicitě jednotlivých látek, zejména pokud jde o jejich směsi. Za tímto účelem je nutno používat právě biologické metody hodnocení, tzv. **biologické testy toxicity**. [1]

Biotest („Bioassay“) je definován jako zkouška, která stanoví množství nebo koncentraci látky v prostředí pomocí reakcí živého organismu. V širším pojetí se jedná o stanovení biologického účinku nějaké látky nebo faktoru prostředí. Protože v přírodě působí faktory komplexně, volí se preferenčně metody laboratorní. Laboratorní testy používají jediný druh organismu, který je vystaven změnám jediného faktoru za časový interval v kontrolovaných podmínkách. [1, [3]

Biotest většinou nemůže říci přesně, která látka a v jakém množství je v příslušném vzorku, to je vyhrazeno až chemické analýze, může však velmi jednoduše a rychle říci, zda je či není ve vzorku biologicky aktivní látka. [4]

Výhodou biologických testů je schopnost vypovídat o vlivu znečištění v celém jeho komplexu, se všemi aditivními, synergistickými a antagonistickými vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími komponenty. Význam biologických testů hodnocení toxicity (ekotoxicity) je hlavně v tom, že postihují souhrn účinků všech přítomných komponent a současně také látek, které nebyly chemickými analýzami prokázány, v testovaném roztoku na testovaný materiál (organismus, kultura, tkáň, buňka). Hlavním cílem testů na biologickém materiálu je stanovení hraniční koncentrace (LC_{50}), ve kterých je možný život testovaných organismů. Testy prováděné na vodních organismech jsou vhodné pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů na skládky, havárií s následkem průniku odpadních vod do povrchových či podzemních vod. [1, [5]

Dělení biologických testů

Testy toxicity na vodních organizmech (biotesty) se mohou provádět v podstatě na třech úrovních:

- na úrovni buněk, tkání (používají se pro teoretické objasnění poznatků získaných při pokusech na organizmech, výhodou je jejich dobrá reprodukovatelnost a naopak nevýhodou je značná odlišnost výsledků „in-vitro“ od výsledků „in-vivo“)
- na úrovni organismů (můžeme se setkat s potížemi spojenými s reprodukovatelností)
- na úrovni společenstev, biocenóz (sleduje se toxický účinek v přírodě či na modelu, nevýhodou je fakt, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně, různé reakce na určitý druh, narušení potravních řetězců) [6]

Nejvíce jsou v současnosti používané testy na úrovni organismů. Výběr organismů k testům toxicity je prováděn tak, aby byly postiženy jednotlivé trofické úrovně ve vodním prostředí. Znamená to prakticky čtyři úrovně, a to bakterie, řasy, zooplankton a ryby. Tyto testy mají široké použití při hodnocení chemických látek, přípravků, výluhů tuhých průmyslových odpadů, sedimentů a odpadních vod. Nejčastěji se aplikují akutní testy toxicity, hlavně v monitorovacích programech. Tyto testy jsou doplněny testy chronickými a reprodukčními, testy genotoxicity, testy bioakumulačními a dalšími.[5]

Biologické testy, používané od 60. let, procházely různými změnami za cílem, co nejvíce je zjednodušit a snížit provozní náklady. V 80. letech si ochrana prostředí vyžádala zvýšenou potřebu zapojit větší množství biotestů, zvláště při ekologických haváriích, kdy bylo nutné získat rychlou odpověď. Rovněž narůstající produkce nových chemických látek si vyžádala zapojení řady biotestů. Zároveň byla potřeba postihnout multitrofický stupeň ekotoxického odhadu a to byl další stupeň vývoje biotestů. Proto dělení biotestů podle Ch. Blaire na tři generace:

- makrobiotesty, klasické testy (standardní, konveční)
- mikrobiotesty
- biosenzory nebo biofondy [7]

2.2.1 Makrobiotesty a klasické testy

Makrobiotesty jsou nazývány první generací biotestů. Standardní testy si nadále udržují své místo v testech toxicity díky mezinárodním normám (ISO, OECD, EPA), které je doporučují.

Standardní testy toxicity prováděné v baňkách se vyvinuly z prvotních eutrofizačních studií „lahvových testů“. Miller sestavil pro řasové zkoušky kultivační aparát, který později vylepšil Ördög. Objem kultivačních Erlenmayerových lahví 500 ml byl ponechán a živný roztok byl z původních 100 ml zvýšen na 250 ml. Aparát byl zdokonalen v sycení směsí vzduchu a CO₂, (dosáhlo se tím vyšší růstové rychlosti), v zavedení světelné a časové periody a v úpravě osvětlení. Zredukoval tak riziko kontaminace, možnou rozložitelnost některých sloučenin a celkově se snížily i náklady. Pro vzdušňované 500 ml testovací nádoby se používaly pro vyhodnocování AGP i u nás. Později byly popsány metody stanovení trofického potenciálu kultivační nádoby dle Rouxe už o nižším objemu, tj. 300 ml s 200 ml pokusného média, které byly umístěny v kultivační aparatuře (prototyp ČAV Třeboň). Toto

nákladné provádění řasových testů si postupem času vyžádalo různé úpravy, které vedly hlavně ke snížení objemu testovacích nádob, média a k zjednodušení celé techniky.[8]

2.2.2 Mikrobiotesty

Mikrobiotesty představují druhou generaci a jsou označovány také jako alternativní testy. I když mikrobiotesty nejsou ještě ve všech státech začleněny v legislativě, přesto někteří odborníci již pracují jen s mikrobiotesty, jiní však zůstávají u standardních testů a mikrobiotesty používají jako doplněk, anebo upřednostňují jen standardní testy.

V mikrobiotestech jsou používány jednobuněčné nebo malé vícebuněčné organismy, např. bakterie (*Vibrio fischeri*, *Escherichia coli*), prvoci (*Spirostomum ambiguum*), řasy (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Desmodesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*), bezobratlí (*Daphnia magna*) a rybí tkáňové kultury.[8]

Základní charakteristika mikrobiotestů:

- miniaturizace
- zkrácení doby inkubace
- zjednodušení a možnost alternací při vyhodnocování testu
- zlevnění biotestů
- zapojení biotestů reprezentujících různě trofické úrovně v ekosystému
- přehodnocování standardních testů (OECD, ISO, EPA, a další organizace)
- využití nových vědeckých poznatků (např. řízení produkce klidových stádií, uchovávání řasových kultur) [9]

Při testování jsou využívány malé testovací nádoby např. mikrotitrační destičky, zkumavky nebo kyvety. Dosáhne se jednak nízké spotřeby materiálu a je možné zpracovat více vzorků najednou. Organismy se dlouhodobě uchovávají v klidových stádiích (bezobratlé), lyofilizovaném stavu (bakterie) nebo v imobilizované formě (řasy) a před testováním se oživí. Doba vlastního akutního testu toxicity se zkrátila na několik hodin až minut, na rozdíl od standardních testů, kde akutní testy trvají až několik dní. Konečný výsledek mikrobiotestu může mít různý charakter, např. počet mrtvých nebo nepohyblivých organismů, změnu absorbance, fluorescence nebo luminiscence. V současnosti jsou mnohé testy k dispozici v podobě tzv. kitů pro jednorázové použití. Mikrobiotesty jsou vhodné nejen pro prescreeningové a screeningové testy, ale také pro subchronické a chronické testy. Významně se uplatňují při monitoringu kontaminace vod, v čistírenském procesu při kontrole toxicity odpadních vod a čistírenských kalů. Pomocí alternativních testů lze sledovat procesy biodegradability látek v modelových a přírodních podmínkách nebo testovat rezidua pesticidů, těžkých kovů a kontaminaci půd. V naší republice alternativní testy našly své uplatnění a jsou využívány zejména pro akutní testy toxicity.[8]



Obr.č. 1: Mikrobiotest [10]

2.2.3 Mikrobiotesty dle způsobu provedení

2.2.3.1 Test ve zkumavkách

Nejstarší popsanou kultivací ve zkumavkách je „Minitest“ vyvinutý ve Švédsku používající 2,5 ml umělohmotné zkumavky míchané 1krát denně. Výtěžek narostlé biomasy je vyhodnocen buď spektrofotometrem nebo počítačem částic, ovšem většinou je spotřebována celá kultura. CO₂ je dodán difúzí přes perforovaný uzávěr zkumavky, neboť probublávání v tak malých zkumavkách není možné. Vývoj tohoto typu kultivace byl zdokonalen postavením zařízení “Limnomaat“. V aparatuře je umístěno 200 plastických zkumavek, v každé je kultivováno 10 ml suspenze, která je míchána bubláním sterilního vzduchu ze dna zkumavek. U každé zkumavky je fotobuňka, která prosvítí každých 20 min zkumavku a hodnoty O.D. jsou sbírány v počítači pro každou zkumavku zvlášť. Výsledky tohoto zařízení jsou srovnatelné se standardní metodou, avšak přípravné práce jsou velmi časově náročné, což eliminuje výhodu automatizace. Na bázi kultivace ve zkumavkách byl založen i řasový test vyvinutý na univerzitě v Ghentu, který prezentoval prof. Persoone v roce 1993 na toxikologickém kongresu v Berlíně. Kultivace probíhá ve skleněných zkumavkách opatřených silikonovými zátkami s 12 ml suspenze. Inhibice je vyhodnocována spektrofotometricky při vlnové délce 663 nm zasunutím zkumavky s médiem a řasou přímo do nástavce spektrofotometru bez otevírání zkumavky. Zkumavky se kultivují na kyvné plošině. Nevýhodou této metody je omezená výměna plynů a následná změna pH. Samotní autoři této metody tento způsob nepovažovali za nejvhodnější a proto se následně zaměřili na kultivaci v kyvetách.[8]

2.2.3.2 Test v sérologických destičkách

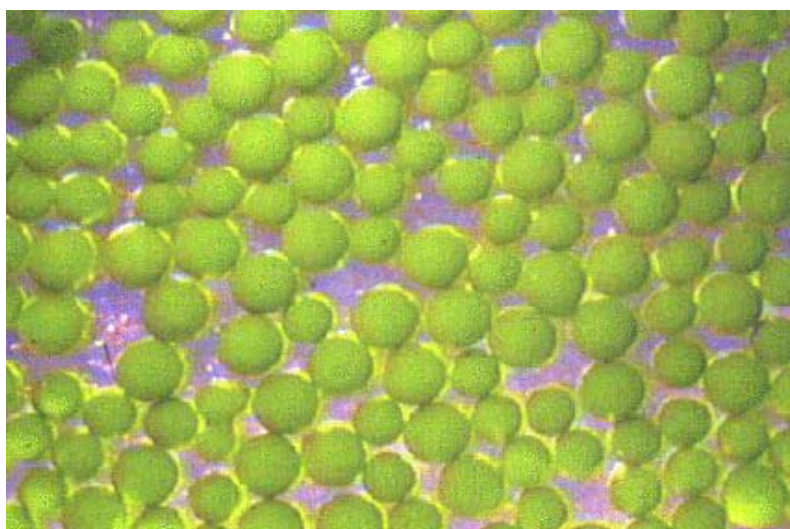
První testy toxicity v sérologických destičkách využívaly 96 jamkové standardní destičky s obsahem jedné jamky 300 μ l. Řasy byly v suspenzi testované vody nebo výluhu a reakce na toxikant byla měřena na počítací částic. Protože se ukázala kvalitní proveditelnost a další výhody této varianty testu, další experimenty usilovaly o uznání tohoto nového mikrotestu vedle osvědčených lahvových zkoušek. Výhody mikrodestiček shrnul Blaire v jedné ze svých publikací:

- spotřeba malého množství vzorku
- menší časová a prostorová náročnost
- zpracování většího počtu vzorků
- možnost automatizace
- zvýšený počet opakování testované koncentrace
- odstranění potenciální kontaminace a problémů spojených s opětovným použitím skla.[8]

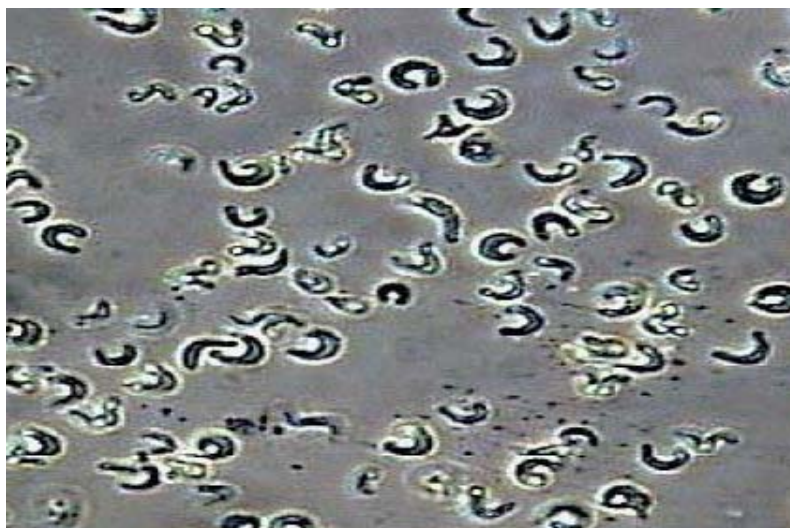
2.2.3.3 Test v kyvetách

V roce 1996 výzkumný tým LABRAP na univerzitě v Ghentu zavedl novou formu kultivace řas a zároveň i uchovávání kultury pod názvem ALGALTOXKIT. Výhoda toxkitu oproti standardní metodě je v uchovávání imobilizovaných řas ve speciální matrici po několik měsíců bez ztráty jejich životaschopnosti. Samotný test se provádí v 100 mm dlouhých kyvetách z polystyrenu s víčkem. Objem řasové suspenze a toxikantu je 25 ml. Test se provádí v osvětleném inkubátoru s řízenou termoregulací. Vyhodnocuje se na spektrofotometru, který je přizpůsoben pro měření v 100 mm kyvetách a má filtr 671 nm.[8]

Řasy jsou vkládány do kyvet, kde vytvoří tzv. řasové shluky, které jsou připraveny k dalšímu použití. Jeden tento shluk obsahuje více než jeden milion řasových buněk.



Obr. č. 2: Řasové shluky [11]



Obr. č. 3: Buňky řas [11]



Obr. č. 4: Souprava pro řasový test v kyvetách[11]

2.2.3.4 Biosenzor s imobilizovanými řasami

Metoda biosenzoru s imobilizovanými řasami spočívá v imobilizaci některé z běžně užívaných řas do agarů.[12] Takto vytvořený biosenzor je přelit testovacím vzorkem nasyceným CO_2 a je exponován na světle. V pravidelných intervalech se měří změna pH. Jeho vzrůst je měřítkem nezávadnosti. K testování slouží 50 ml skleněné či plastové nádoby. Metoda biosenzoru s imobilizovanými řasami byla srovnávána s růstovým testem v mikroděstičkách. Citlivější se ukázal test v sérologických destičkách, kde byl růst čtyř sladkovodních druhů řas zastaven při koncentraci dichromanu draselného v rozsahu $0,3 - 1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, zatímco v případě biosenzoru s imobilizovanými řasami přestal nárůst pH v rozsahu koncentrací $1,5 - 5,0 \text{ mg.l}^{-1} \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Výhodou této metody je dlouhodobé uchování imobilizované řasy v chladničce, rychlost, jednoduchost a možnost provedení v terénu.[8]

2.2.3.5 Varianta s agarem na Petriho miskách

Agarem (přírodní polysacharid) zpevněný vzorek se nalije do Petriho misky a po povrchu se rozetře zředěné či husté inokulum. Výsledkem jsou jednoklonové kolonie či souvislý nárost. Kolonie je možné proměřovat a detekovat mutagenní vlivy, které se projeví změnami v barvě, velikosti a vzhledu kolonií. Nárost lze smýt pro stanovení sušiny a biochemické analýzy.[8]

2.2.4 Jednotlivé typy mikrobiotestů

2.2.4.1 Toxikity

Mikrobiotesty využívající klidových stádií zooplanktonu. Testovací organismus je vylíhnut z klidových stádií (cyst, efiřpi) během 20-24 hodin. 24-hodinový akutní test toxicity probíhá na destičkách při teplotě 25°C. Kritériem hodnocení je mortalita, ze které se počítá hodnota LC₅₀. [8, [28]

2.2.4.2 Řasový mikrobiotest

Také v oblasti řasových testů lze sledovat obecný trend k miniaturizace, zvýšení citlivosti a zjednodušení testovací aparatury. Od standardních Erlenmayerových lahví vedl trend přes minitest ve zkumavkách až po mikrotext v sérologických destičkách. Více rozebráno později, viz 2.4.[8, [30]

2.2.4.3 Bakteriální testy toxicity

Bakteriální bioluminiscenční test toxicity (BBTT)

Procedura je založena na schopnosti mořských světélkujících bakterií reagovat změnou bioluminiscence na přítomnost xenobiotik v jejich okolí. Luminiscenční bakterie, které výrobce dodává v dehydratovaném stavu zaručujícím dostatečnou reziduální bioluminiscenci, se až do stanovení toxicity uchovávají v chladu a rehydratují se teprve těsně před použitím. Po resuscitaci se suspenze používá jako obyčejná chemikálie, žádná speciální biologická erudice není nutná.[8]

2.2.4.4 Alternativní biotesty s fluorescenčně značenými markery

Slouží pro rychlou detekci toxických látek (1 hod). Přidávání specifických fluorescenčně značených látek k testovacím organismům (například k vířníkům, k řasám). Organismy se exponují testovaným vzorkem spolu s látkou, pomocí které se zjistí její aktivita klíčových enzymů ve stresovaném organismu. Takovým způsobem působí fluorescein diacetát, který je esterázami metabolizován na flouroscentní produkt. Enzymová inhibice determinována jako snížená fluorescence pak může být vizualizovaná nebo kvantifikována na fluorometru. Fluorescenční technika s FDA může být zároveň použita i pro determinaci životnosti buňky. FDA je lipofilní molekula, která může být snadno přijímaná do buňky.[13] Intenzita fluorescence pak kromě esterázové aktivity závisí i na integritě buněčné membrány a obě tyto vlastnosti určují životaschopnost buňky.[14]



Obr. č. 5: Digitální fluorometr – Quantech [15]

2.2.5 Biosenzory nebo biofondy

Jsou označovány jako třetí generace ekotoxikologických testů. V současnosti jsou na úrovni základního výzkumu a jejich uplatnění se čekává zejména v on-line monitorovacích systémech a skriningových testech toxicity.[7]

2.3 Řasy

Řasy jako zástupci primárních producentů ve vodních ekosystémech hrají v ekotoxikologickém testování významnou roli.[12]

Řasy jsou mikroskopicky (většinou) pozorovatelné nižší rostliny (*Thallobionta*), které řadíme z hlediska charakteru buňky mezi organismy eukaryotické (jádro s jadernou membránou). Jejich tělo tvoří stélka.[16]

Řasy žijí převážně ve vodním prostředí, kde tvoří autotrofní složku společenstva. Jejich výskyt je dán charakterem biotopu a ročního období (sezónní dynamika druhů). Z hlediska obývaného biotopu stojatých a tekoucích vod lze rozlišit řasy fytoplanktonní (osidlují volnou vodu, vznášejí se pasivně nebo se pohybují pomocí bičíků a brv), perifytonní (tvoří nárosty na ponořených rostlinách, kamenech a jiných substrátech) a bentické (obývající dno).[6]

Oddělení:	Třída:
<i>Rhodophyta</i> (ruduchy)	<i>Rhodophyceae</i>
<i>Dinophyta</i> (obrněnky)	<i>Dinophyceae</i>
<i>Cryptophyta</i> (skrytěnky)	<i>Cryptophyceae</i>
<i>Chromophyta</i>	<i>Chrysophyceae</i> (zlativky)
	<i>Bacillariophyceae</i> , syn. <i>Diatomae</i> (rozsivky)
	<i>Xanthophyceae</i> (různobrvou)
<i>Euglenophyta</i> (krásnoočka)	<i>Euglenophyceae</i>
<i>Chlorophyta</i> (zelené řasy)	<i>Chlamydomonadales</i> (chlamydomonády)
	<i>Chlorophyceae</i> (zelenivky)
	<i>Ulvophyceae</i> (vláknité řasy)
	<i>Zygnematophyceae</i> (spájkivé řasy)
	<i>Charophyceae</i> (parožnatky)

Tabulka č. 1: Zjednodušený přehled hlavních taxonomických skupin řas [6]

2.4 Řasové testy - teorie

2.4.1 Význam řasových testů

Řasové testy toxicity slouží k testování možných toxických účinků látek a vzorků na vodní producenty. Test umožňuje sledovat nejen inhibiční (toxické) účinky látek, ale také stimulační efekty, tzv. úživnost. Díky rychlému nárůstu řas je možné kromě akutního působení pozorovat i chronické účinky testovaných látek.

Řasové testy mají nezastupitelné místo v baterii ekotoxikologických testů, zejména proto, že řasy jako primární producenti stojí na začátku potravního řetězce a nelze je nahradit jinými testovacími systémy. Testy toxicity na řasách jsou však velmi náročné na preciznost a reprodukovatelnost provedení, tak na laboratorní vybavení. V současné době je největší pozornost věnována miniaturizaci či alespoň zjednodušení řasových testů toxicity.[6]

2.4.2 Dělení řasových testů dle typu řas

2.4.2.1 Řasové testy s mořskými řasami

Algal marine bioassay, ISO 10253. Používající rozsivku *Phaeodactylum tricornutum*. [30]

2.4.2.2 Řasové testy se sladkovodními řasami

Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus quadricauda*, *Desmodesmus subspicatus*, *Pseudokirchneriella subcapitata* je standardizována metodikou ČSN EN ISO 8692 (viz 2.5). [30]

2.4.3 Dělení dle použité kultury

2.4.3.1 Jednodruhové

Při testu použijeme jen jeden druh, jeden typ řasy. Například řasu *Pseudokirchneriella subcapitata*. [12]

2.4.3.2 Multispecies test

Tento test pracuje se zástupci zelených řas, rozsivek a sinic známých abundancí (počet jedinců téhož druhu na určitém místě) na začátku testu. [12]

2.4.4 Další dělení

2.4.4.1 Růstový biotest

Růstový biotest je nejpoužívanějším řasovým testem. Je to test toxicity na řasách založený na růstu řas a je nejspolehlivějším kritériem pro stanovení toxicity či trofie vody. Reprodukční proces je nejcitlivějším, kritickým momentem v životním cyklu všech organismů. Pokud je testovací organismus schopen v testovaném vzorku úspěšně se rozmnožovat alespoň tři generace, pak je velmi pravděpodobné, že tuto látku bude snášet trvale. [6]

2.4.4.2 Test barvením FDA

Fluorescein diacetát se připravuje ředěním v acetonu nebo dimethylsulfoxidu, řasa se inkubuje s testovanou látkou 5 hodin. Poté se FDA smíchá s řasou, jako blank se smíchá řasa s ředící organickou látkou a voda s FDA. Délka inkubace je různá (4-60 minut) a může probíhat na mikrotitračních destičkách nebo ve zkumavkách. Obarvené buňky jsou excitovány světlem z argonového laseru (488 nm) a měří se zelená (530 nm) fluorescence a červená (> 620 nm) autofluorescence. Množství živých zeleně fluoreskujících buněk ve směsi je stanovováno epifluorescenční mikroskopií nebo průtokovým cytometrem. [9]

2.4.5 Vliv na řasové testy

2.4.5.1 Živné médium

Řasové testy toxicity jsou prováděny v obohaceném tekutém mediu, obsahujícím směs živin. Pro kultivaci řas jsou používána různá, převážně syntetická media, která se liší svým složením. [8]

2.4.5.2 Teplota

Teplota, při které test probíhá, by měla odpovídat teplotnímu optimu testovaného druhu řasy. Kultivační teploty předepisované normami jsou stanoveny bez ohledu na fyziologické vlastnosti řas. Rozmezí udávané např. ISO 23 ± 2 °C nebo OECD 21 - 25 ± 2 °C, jsou pro druhy *Pseudokirchneriella capricornutum* a *Desmodesmus subspicatus* pod optimem. [27]

2.4.5.3 Osvětlení

Růstová rychlost řas se zvyšuje se světelnou intenzitou podél saturační křivky. Hladina pro světelnou saturaci (nasycenost) je druhově závislá a závisí také na teplotě a živinovém stavu řas. Standardizovaný test předepisuje kontinuální osvětlení s poměrně přesně definovaným spektrálním složením světla, tj. 400 - 700 nm a světelnou intenzitu v rozsahu 60 - 120 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nebo osvětlení přibližně 8 000 lx u norem ISO, OECD a EEC. Tato ozářenost je však nízká vzhledem k předepsané teplotě (přibližně 23 - 24 °C) zejména pro nejčastěji používané druhy *Pseudokirchneriella capricornutum* a *Desmodesmus subspicatus*. Problém je také v tom, že světlo absorbují i samotná řasová suspenze. Míchání kultury tento efekt může redukovat. V testu toxicity by měly být světelné podmínky konstantní, aby podporovaly exponenciální růst, kterého je dosaženo při držení nízké koncentrace biomasy, při stálém míchání a při použití malého objemu kultury řas.[8]

2.4.5.4 Velikost inokula

Inokulum, neboli počet řasových buněk na začátku testu. Inokulum musí být adaptováno na již zmíněné podmínky testu (teplotu, tlak, osvětlení).[8]

2.5 Řasové testy – praxe

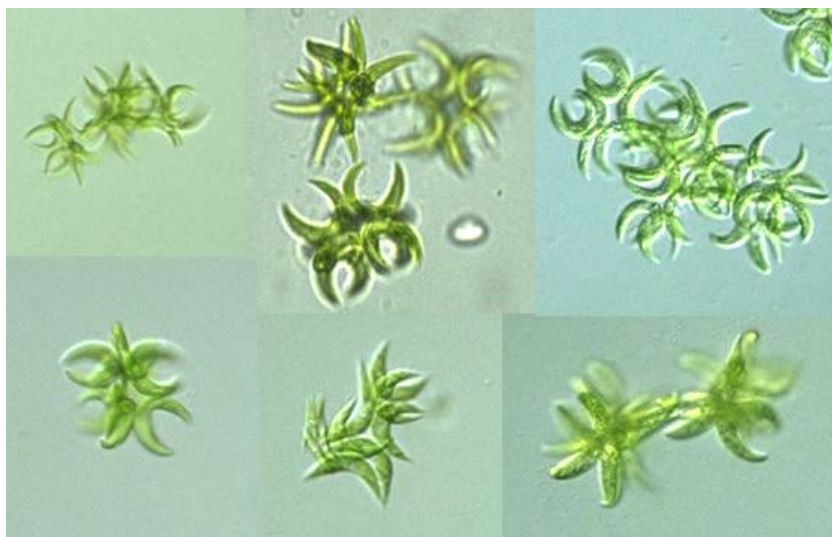
2.5.1 Charakteristika řasového testu

Test spočívá v měření nárůstu koncentrace biomasy řas v jednotlivých testovaných koncentracích toxického vzorku ve srovnání s kontrolou tvořenou řasovým živným médiem. Řasy jsou kultivovány za stálých světelných i teplotních podmínek. Dle doby expozice lze test uspořádat jako akutní (cca 72 hodin), semichronický (cca 96 hodin) či chronický (více než 96 hodin). Zásobní kultury řas se pěstují v zábrusových baňkách za stálé aerace. Přiváděný vzduch je nejprve čištěn na bakteriálním filtru od řas či bakterií volně poletujících v okolním prostředí, poté je veden přímo do řasové suspenze. Přívodem vzduchu je kultuře dodáván dostatek CO_2 nutný pro její růst.[12]

2.6 Řasový test – standardní

2.6.1 Testovací organismy

Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas *Scenedesmus quadricauda*, *Desmodesmus subspicatus* (dříve *Scenedesmus subspicatus*), *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve *Selenastrum capricornutum*) je standardizována metodikou ČSN EN ISO 8692.



Obr. č. 6: *Pseudokirchneriella subcapitata* [17]



Obr. č. 7: *Desmodesmus subspicatus* [18]

Oba druhy řas jsou planktonní zelené řasy patřící do řádu *Chlorococcales* a v kultuře jsou obvykle jednobuněčné.[29]

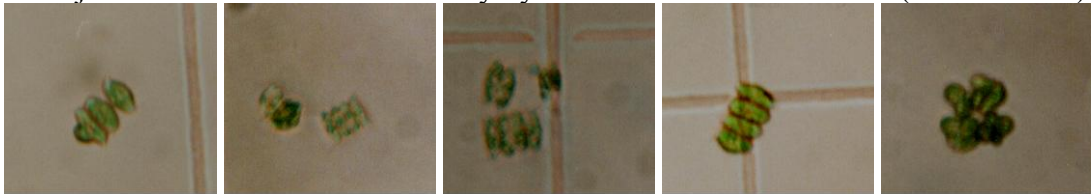
2.6.2 Princip

Princip testu spočívá ve stanovení toxického účinku vodou vyluhovatelné látky na inhibici růstu a rozmnožování chlorokokální řasy v jednotlivých koncentracích sledované ve srovnání s kontrolami v čistém živném vzorku (viz obr. č. 8).



Obr. č. 8: Jednotlivé testované koncentrace zkoušené látky v Erlenmayerových baňkách s chlorokokální řasou *Scenedesmus quadricauda*. Kultura řasy v zásobní baňce.[6]

Při testu je vhodné zaznamenávat i odchylky od normálního tvaru buněk (viz obr. 9a–e).



Obr. č. 9: a b c d e [6]

Pro testování lze použít kulturu chlorokokální řasy *Scenedesmus quadricauda* kmen Greifswald 15 (viz obr. č. 10).



Obr. č. 10: Chlorokokální řasa *Scenedesmus quadricauda* kmen Greifswald 15 (čtyřbuněčné cenobium) na rastru počítací komůrky.[6]

2.6.3 Živné média

Připraví se čtyři zásobní roztoky živin podle složení uvedeného v tabulce č. 2.

Zásobní roztok	Živina	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku	Konečná hmotnostní koncentrace ve zkoušeném roztoku
Zásobní roztok 1: makrosložky živin	NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l
Zásobní roztok 2: Fe-EDTA	FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/l	64 μg/l
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/l	100 μg/l
Zásobní roztok 3: stopové prvky	H ₃ BO ₃	185 mg/l	185 μg/l
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l	415 μg/l
	ZnCl ₂	3 mg/l	3 μg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 μg/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l	0,01 μg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l	7 μg/l
Zásobní roztok 4: NaHCO ₃	NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l

Tabulka č. 2: Hmotnostní koncentrace živin ve zkoušeném roztoku [19]

Tyto roztoky se následně ředí (viz 2.6.5.1), abychom získali konečné koncentrace živin ve zkoumaných roztocích.

Zásobní roztoky se sterilizují membránovou filtrací (průměr póru 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 min). Roztoky se uchovávají ve tmě při 4 °C.[19]

2.6.4 Pomůcky

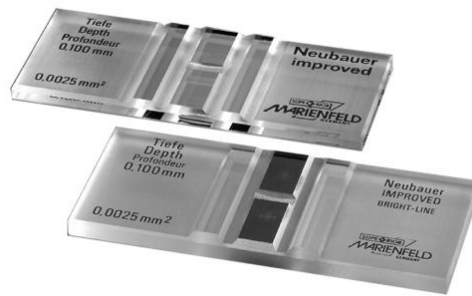
Veškerý materiál, který přijde do styku s médiem musí být vyroben ze skla nebo z jiného inertního materiálu. Pro řasový test je třeba obvyklé laboratorní náčiní (pipety, byrety, kyvety, kádinky a podobně). Zde zdůrazním jen pomůcky, jež nejsou běžně dostupné.

- Počítací komůrka Cyrus I: materiálem podložky je optické sklo, hloubka komůrky odpovídá 0,1 mm, velikosti polí jsou 1/16, 1/32 a 1/62 mm². Rozměry Cyrusovi komůrky jsou 25x75x3 mm (obr.č. 11) [20]



Obr. č. 11: Počítací komůrky (Cyrusova komůrka) [20]

nebo Bürkerova počítací komůrka:



Obr. č. 12: Bürkerova komůrka [21]

- Mikroskop:



Obr. č. 13: Mikroskop ERUDIT DLX 40x-1000x [22]

Tyto pomůcky jsou potřebné pro měření hustoty buněk řas a je možné je případně nahradit počítačem částic.

- Klimatizovaný box nebo místnost s bílou zářivkou. viz 2.4.6.
- Kultivační baňky: nejčastěji se používají kónické baňky (Erlenmayerovy baňky) o objemu 250 ml se zátkami propouštějícími vzduch.
- Přístroj pro membránovou filtraci používající filtry s průměrem póru 0,2 μm .
- Autokláv
- pH metr [19]



Obr. č. 14: kapesní pH metr – VARIO [24]

2.6.5 Postup

2.6.5.1 Příprava růstového média

Růstové médium se připraví přidáním příslušného objemu zásobních roztoků živin (z tab. č 2) k vodě. Asi k 500 ml vody přidáme 10 ml zásobního roztoku 1, 1 ml zásobního roztoku 2, 1 ml zásobního roztoku 3 a 1 ml zásobního roztoku 4. Nakonec přidáme ještě asi 1000 ml vody. V případě nutné sterilizace autoklávováním, měl by být zásobní roztok 4 přidán později.[19]

Kmenová kultura se udržuje na šikmém 1,5 % agaru ve standardním živném médiu v zazátkovaných zkumavkách sterilně uložených v termoluminostatu s osvětlením minimálně 6 000 luxů. V případě potřeby se kultura přeočkovává do živného média o objemu cca 100 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk, čímž se připraví zásobní inokulační kultura řas, udržovaná za stejných podmínek jako kmenová kultura. Řasové inokulum pro test se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury. Nejprve se zjistí hustota inokulační kultury v počítací komůrce Cyrus I. (viz obr. č.11). Po přípravě ředící řady testované látky se ke každé koncentraci i ke kontrole přidá stejný objem řasové suspenze, jejíž množství se zjistí výpočtem. Počáteční hustota řasové suspenze po naočkování by měla odpovídat počtu 20 000 cenobií v 1 ml.[6]

Kultivační baňky se vzorky o objemu 50 ml s inokulem uzavřou buničitými zátkami a umístí se do termoluminostatu s osvětlením 6 000 až 10 000 luxů a teplotou $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Test probíhá po dobu minimálně 72 hodin, během této doby se vzorek alespoň třikrát denně promíchává. Od počátku až po konec testu se hodnotí růst řasových buněk v nasazených koncentracích s četností jednou denně. Při zvolené delší době expozice se hodnocení provádí řádově v dvou až čtyřdenních intervalech.[19]

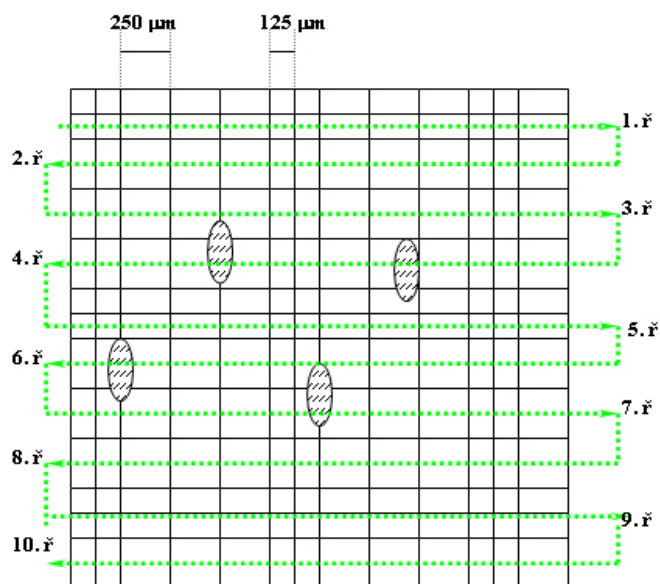
2.6.6 Vyhodnocení testu

2.6.6.1 Řasová hustota

Pro zjištění řasové hustoty použijeme počítací komůrku Cyrus, nebo počítací komůrku typu Bürker.

Vyhodnocení vyšetřené plochy počítací komůrky typu Cyrus I

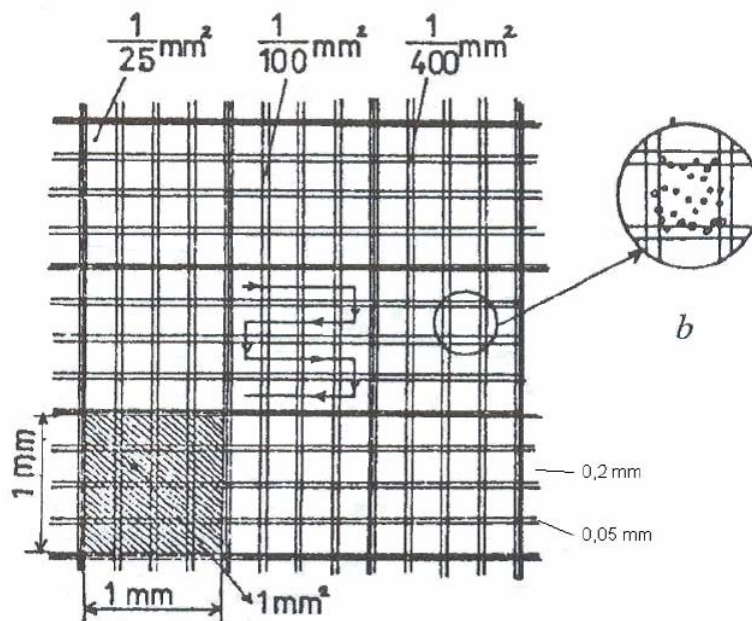
Postup kvantifikace je zachycen na části komůrky, která má jinak 40 vodorovných a 40 svislých řad čtverečků o velikosti $250 \times 250 \mu\text{m}$. V případě zjišťování počtu organismů na ploše počítací komůrky se postupuje tak, že se začínají počítat organismy od 1. řádku zleva směrem doprava, po provedení kvantifikace se provádí kvantifikace ve 2. řádku zprava doleva, atd. až např. do 10. řádku. Organismy částečně se dotýkající či mírně zasahující do plochy vyšetřovaného pásu se nepočítají; počítají se až v dalším posunu (na obr. č. 15 organismus mírně zasahující do 3. ř. se počítá až do 4. ř.). Je-li celkový počet organismů na této ploše o 40 čtvercích roven 4 (obr. č. 14), potom se použije koeficient pro zjištění organismů celkem na ploše celé komůrky a v 1 ml (zde $k = 4 \times 2$, viz tabulka), tj. $4 \text{ org.} \times 8$, tj. 32 org. v 1 ml vzorku.[6]



Obr. č. 15: Detail počítací komůrky typu Cyrus I [6, 24]

Vyhodnocení vyšetřené plochy Bürkerovy komůrky

Bürkerova počítací komůrka má ve střední části dvě mřížky, skládající se z velkých čtverců a obdélníků. Ploška velkých čtverců je $1/25 \text{ mm}^2$, malých čtverců $1/400 \text{ mm}^2$ a obdélníků $1/100 \text{ mm}^2$. Hloubka prostoru mezi sklíčky je $0,1 \text{ mm} \Rightarrow$ objemy $1/250 \text{ mm}^3$, $1/4000 \text{ mm}^3$ a $1/1000 \text{ mm}^3$ (viz obr. č.16).[23]



Obr. č. 16: Detail mřížky Bürkerovy komůrky [23]

Pokud je buněk moc nebo málo, komůrka se opláchne a připraví se znovu s jiným zředěním. Počítáme buňky uvnitř čtverce a ty, které leží nebo se dotýkají 2 zvolených stran (obvykle se volí horní a pravá strana). Důležité použít tlusté krycí sklíčko, jelikož při použití užšího krycího sklíčka může dojít k podhodnocení přibližně na 80%. [23]

Výpočet počtu buněk MO v 1 ml kultury (y):

$$y = MO_x \cdot z \cdot X \cdot 1000 \quad (1)$$

- MO_x průměrný počet buněk v jednom čtverci (celkem spočítaných děleno počtem čtverců)
- z použité zředění
- X přepočten na 1 mm^3 (pro velký čtverec 250, malý čtverec 4000, obdélník 1000)
- 1000 přepočten z mm^3 na ml [23]

2.6.6.2 Potřebný objem inokula

Výpočet potřebného objemu inokula provedeme pomocí vzorce

$$x = \frac{(V \cdot c)}{a} \quad (2)$$

- x potřebný objem inokula [ml]
- c požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu v 1 ml (zde 20000 cenobií)
- V množství testovaného roztoku [ml]
- a hustota inokulační kultury (počet v 1 ml) [25]

2.6.6.3 Růstová rychlost

Na konci testu se z naměřených hodnot zjišťuje růstová rychlost μ a integrál biomasy A , nebo-li plochy pod růstovými křivkami, v jednotlivých vzorcích a z těchto hodnot se v porovnání s kontrolní koncentrací stanoví inhibice I_μ a I_A . Z obou hodnot inhibic lze stanovit inhibiční koncentraci IC_{50} , u které lze rozlišit způsob výpočtu koeficienty. V případě použití hodnoty I_μ se používá označení I_rC_{50} (index r značí použití hodnoty růstové rychlosti), obdobně při použití hodnoty I_A se používá označení I_bC_{50} (index b značí použití hodnoty velikosti vytvořené biomasy). Koncentrace ${}_{72h}IC_{50}$ se stanovuje stejným způsobem, jako v případě předchozích testů, tzn. probitovou regresní analýzou.[19]

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n} \quad (3)$$

N_n počet cenobií v 1 ml na konci testu
 N_0 počet cenobií v 1 ml na počátku testu
 t_n doba trvání testu [dny]

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (4)$$

I_μ procento inhibice růstu [%]
 μ_c růstová rychlost v kontrole
 μ_i růstová rychlost ve sledované koncentraci

Pokud je I_μ menší než 0, jedná se o stimulaci růstu.

$$A = \frac{(N_1 - N_0) \cdot t_1}{2} + \frac{(N_1 + N_2 - 2N_0) \cdot (t_2 - t_1)}{2} + \dots + \frac{(N_{n-1} + N_n - N_0) \cdot (t_n - t_{n-1})}{2} \quad (5)$$

N_n počet cenobií v 1 ml v čase t_n
 N_l počet cenobií v 1 ml v čase t_l
 t_n doba n-tého měření testu od počátku [dny]
 t_l doba prvního měření testu od počátku testu

$$I_A = \frac{A_c - A_i}{A_c} \cdot 100 \quad (6)$$

I_A inhibice integrálu biomasy [%]
 A_c růstová rychlost v kontrole
 A_i růstová rychlost ve sledované koncentraci

Pokud je I_A menší než 0, jedná se o stimulaci růstu.

Zjištěná inhibice jsou převedeny na probity a vyneseny do grafu na ose y proti logaritmům koncentrací na ose x , lineární regresí je vypočítána hodnota IC_{50} . [6][25]

2.7 Řasový test - mikrobiotest

2.7.1 Princip

Řasový mikrobiotest je důsledkem snahy o snižování nákladů a časové náročnosti klasických řasových testů. Místo Erlenmayerových baněk se pro kultivaci řasové suspenze používají mikrotitrační destičky. Tím se výrazně sníží spotřeba kultivačních médií, ale především se omezí potřebné množství testovaného vzorků, jež často bývá limitující pro provedení testu.[27]

2.7.2 Postup

Udržování řasové kultury se provádí stejně, jako tomu je popsáno u bodu 2.5.2.2

Prvním krokem je příprava zásobní řasové kultury. Řasu je nutno předkultivovat za stejných podmínek (teplota, osvětlení, složení média) jako probíhá vlastní test.[27]

Zásobní kultura řasy v exponenciální fázi růstu se naředí na požadovanou koncentraci, čímž je připravena k vlastnímu testu. Hustota zásobní řasové kultury se stanovuje počítáním buněk v počítací komůrce Cyrus II. Přes mikroskop zjistíme počet buněk v cca 10 čtvercích. Ze známého objemu jednotlivých čtverců se zjistí získaný průměrný údaj o počtu buněk ve čtvercích na koncentraci řas v ml.[31]

Dalším krokem je příprava koncentrační řady testované látky. Vzorek se ředí médiem používaným pro kultivaci řas (tab. č. 3, 4). Odměrné baňky se naplní ze 2/3 kultivačním médiem, přidá se požadované množství vzorku a vše se promíchá. Nadávkuje se inokulum tak, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 10 000 ks/ml, baňka se doplní médiem po rysku a vše se opět důkladně promíchá. Kromě testovaných koncentrací je třeba připravit i kontrolní suspenzi („kontrolu“) obsahující pouze médium a inokulum.

Koncentrace řasové suspenze se v průběhu testu měří spektrofotometricky. Kromě řas absorbuje část záření kultivační médium a vzorek samotný, což může způsobit pozitivní chybu. Tuto chybu je možné částečně eliminovat odečtením absorbance jednotlivých testovaných koncentrací neobsahujících řasu. Je tedy nutné připravit koncentrační řadu vzorku stejnou jako pro testování toxicity, ale bez přídavku inokula.[6]

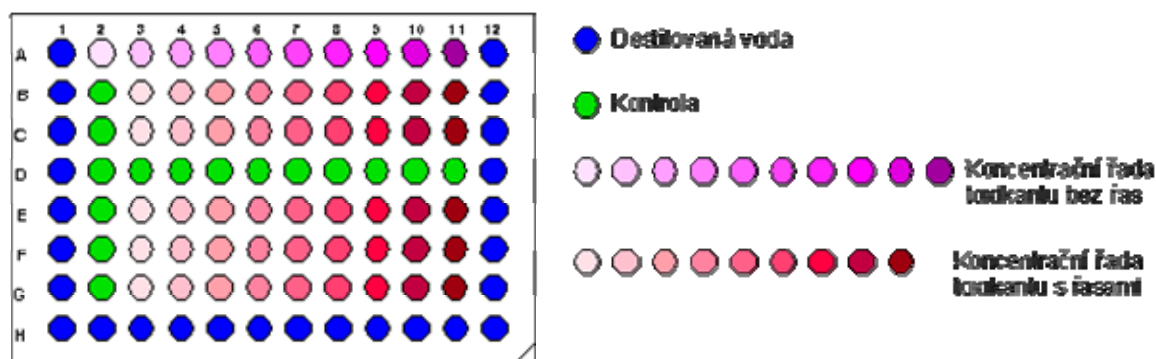
chemikálie	koncentrace [mg/l]
NaNO ₃	467
Ca(NO ₂) ₂ ·4H ₂ O	59
K ₂ HPO ₄	31
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25
Na ₂ CO ₃	21
FeCl ₃	1
	koncentrace [ml/l]
Graffonův roztok	0,08

Tab. č. 3: Složení média pro kultivaci sladkovodních řas

chemikálie	koncentrace [mg/l]
H ₃ BO ₃	3100
MnSO ₄ ·3H ₂ O	2230
Na ₂ CO ₄ ·2H ₂ O	33
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	88
KBr	119
KI	83
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	154
Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	146
CuSO ₄ ·5H ₂ O	125
NiSO ₃ ·(NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	198
Cr(NO ₃) ₃ ·7H ₂ O	37
V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	35
Al ₂ (SO ₄) ₃	474

Tab. č. 4: Roztok stopových prvků podle Gaffrona

Připravené koncentrace se dávkuje do destiček (ploché dno, 9x12 cm, 96 jamek po 300 ml) v množství 250 ml do jamky. Před pipetováním je nezbytné roztok řádně promíchat, protože řasy poměrně rychle sedimentují. Roztoky se do jamek v destičce dávkuje podle uvedeného schématu (Obr. č. 16). Do jamek A2 – A11 koncentrace toxikantu bez inokula. Koncentrace se zvyšuje zleva doprava, jamka A2 obsahuje médium bez toxikantu. Do sloupce „2“ (jamka B-G) a řádku „D“ (jamka 3-11) se dávkuje kontrola. Testované koncentrace se pipetují do sloupce 3-11 v rozmezí řádků B-G. Koncentrace vzrůstá zleva doprava. Jednotlivé sloupečky jsou naplněny roztokem o stejné koncentraci. Zbývající jamky po obvodu destičky se plní destilovanou vodou. Celá destička se překryje parafilmem a víčkem.[6]



Obr. č. 16: Schéma dávkování roztoků do jamek mikrotitrační destičky

Expozice probíhá při teplotě 27 ± 2 °C v uzavřeném boxu s konstantním plošným osvětlením o intenzitě $26 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ (6 000 lx).

Hustotu kultury se zjišťuje každých 24 hodin až po dosažení stacionární fáze.[28]

2.7.3 Měření hustoty řasové kultury

Hustota řasové kultury se stanovuje spektrofotometrickým měřením. V jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky se změří absorbance a na základě kalibrační křivky se přepočte na koncentraci řas v roztoku.[26]

2.7.4 Testovací organismus

Pro tento test se používá stejný typ řasy jako pro standardní test, tedy *Desmodesmus subspicatus*. Základní charakter této řasy je popsán v kapitole 2.6.1.[27]

2.7.5 Živné médium a vzorek

Testovaný vzorek – roztok neznámé látky

Živné médium – řasové médium pro kultivaci řas se skládá z neionizované vody a do ní nadávkovaných předepsaných koncentrací určitých solí.[28]

2.7.6 Přístroje a pomůcky

- Termoluminostat: kultivační komora zajišťující stálé osvětlení a konstantní teplotu
- Laminární flow-box: zařízení pro práci v ochranné atmosféře
- Mikroskop s počítací komůrkou Bürker nebo Cyrus (I, II)
- Automatické pipety
- pH metr [28]

3 ZÁVĚR

Ekotoxicitu látek lze stanovit a vyhodnocovat pomocí různých biotestů. Biotesty používají bakterie, prvoky, řasy, bezobratlé živočichy nebo rybí tkáňové kultury jako testovacích organismů.

V této bakalářské práci byly popsány testy na řasách, které mají nenahraditelné zastoupení v testech ekotoxicity, jelikož řasy jsou prvotním článkem potravního řetězce. Řasové testy lze provádět jak na mořských řasách, tak i na sladkovodních. Nejčastěji používanými řasami jsou *Desmodesmus subspicatus* a *Pseudokirchneriella subcapitata*, které jsou také uvedeny v normě ČSN EN ISO 8692. Řasové testy můžeme také dělit podle způsobu provedení na „starší“ testy klasické a „moderní“ mikrobiotesty. V práci byly zde popsány postupy a také výhody obou způsobů testování, což je u klasické metody použití „jednoduchého“ chemického náčiní a u mikrobiotestu rychlost a malá spotřeba řas. Nakonec každý, kdo bude provádět řasový test, se sám rozhodne, co je pro něj větší výhodou s pohledu experimentu, avšak musí být splněny podmínky uvedené v normě ČSN EN 8692, a to fyzikálně chemické parametry (složení živného média, teplota, osvětlení) a provést validaci testu pomocí dichromanu draselného.

4 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SVOBODOVÁ, Z., et al. EKOTOXIKOLOGIE - praktická cvičení, část I. 1. vyd. Brno : Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity, 2000. 72 s. ISBN 80-85114-95-X.
- [2] *Toxicita* [online]. [2005] [cit. 2009-05-12]. Dostupný z WWW: <<http://old.mendelu.cz/~agro/af/rybari/vyuka/hydrochem/toxicita.pdf>>.
- [3] MAXAM, G., RILA, J.-P., DOTT, W. Use of Bioassays for Assessment of Water-Extractable Ecotoxic Potential of Soils . *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000, vol. 45, is. 3, s. 240-246
- [4] LUKAVSKÝ, J. Miniaturized algal growth bioassay. Aubrecht, Monitoring of Ecological Change in Wetlands of Modele Europe, [1994].
- [5] MARŠÁLEK, B., HILSCEROVÁ, K. *Ekotoxikologické biotesty : Rozdělení, přehled, použití*. Brno : RECETOX, 2007. 38 s.
- [6] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Řasy*. From *Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-03-24].
- [7] BLAIRE, CH. *Microbiotest in aquatic ecotoxicology: chyracteristic, utility, and prospekt*. *Env. Tox. Wat. Qual.* 6, [1991] 145-155
- [8] ROJÍČKOVÁ, R., DVOŘÁKOVÁ, D., MARŠÁLEK, B. The use of miniaturized algal bioassays in comparison to the standard flask assay. *Environmental Toxicology and Water Quality* [online]. 1998, vol. 13, is. 3 [cit. 2009-05-20], s. 235-241.
- [9] MARŠÁLEK, B., MIKROBIOTESTY – Druhá generace ekotoxikologických biotestů. Brno : Botanický ústav AVČR, [2005]. 42 p
- [10] KOČÍ, V., MLEJNEK, M. *Řasový mikrobiotest* [online]. 1. Praha : Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, 2008 [cit. 2009-05-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/uchop/ekotoxikologie/dokumenty/mikrometodaras.htm>>.
- [11] *ALGALTOXKIT F(TM)* [online]. [2005] [cit. 2009-05-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.microbiotests.be/toxkits/algaltokitf.pdf>>.
- [12] LUKAVSKÝ, J., MARŠÁLEK, B. The evaluation of toxicity by a biosensor with immobilized algae *Arch.Hydrobiol/Algological Studies* 85: [1997], 147-155.
- [13] GALA W. R., GIESY J. P.: *Flow cytometric determination od the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga Selenastrum caprocornutum*. *Envir. Tox. Chem* 13, 831-840 (1994).
- [14] EISENTRAEGER, A., et al. Comparative studies on algal toxicity testing using fluorometric microplate and Erlenmeyer flask growth-inhibition assays . *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2003, vol. 54, is. 3 [cit. 2009-05-20], s. 346-354.
- [15] *PRAGOLAB* [online]. 2007 [cit. 2009-05-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.pragolab.cz/clanek/21/quantech-digitalni-fluorometr>>.
- [16] WÄNGBERG, S.-A., BLANCK, H. Multivariate patterns of algalnext term sensitivity to chemicals in relation to phylogeny . *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 1988, vol. 16, is. 1 [cit. 2009-05-15], s. 72-82.
- [17] VALDMANN, E. National Institute of Chemical Physics and Biophysics [online]. 2009 [cit. 2009-05-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.kbfi.ee/?id=213<=>eng>>.

- [18] PŘIBYL, P. Culture Collection of Autotrophic Organisms [online]. 2008 [cit. 2009-05-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.butbn.cas.cz/ccala/index.php?page=sr&cb1=Algae>>.
- [19] ČSN EN ISO 8692. *Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*. Praha : Český normalizační institut, 2005. 17 p.
- [20] L.E.T. Optomechanika [online]. Praha. 2008 [cit. 2009-05-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.letpraha.cz/>>.
- [21] VITRUM [online]. 2008 [cit. 2009-05-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.vitrum.cz/index.php?action=produkty&cat=876>>.
- [22] Dalekohledy a mikroskopy [online]. 2002 [cit. 2009-05-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.dalekohledy.com/store/goods-5102000-21-mikroskop-erudit-dlx-40x1000x.html>>.
- [23] VESELÁ, M., DRDÁK, M. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. přeprac. vyd. Brno : Vysoké učení technické, 1999. 88 s. ISBN 80-214_1305-0.
- [24] MERCI [online]. 2004 , 5.5.2009 [cit. 2009-05-19]. Dostupný z WWW: <http://www.merci.cz/katalog/mereni-velicin/504_kapesni-a-prenosne-ph-metry>.
- [25] ŠEJNOHOVÁ, L. *Různé metody hodnocení kvantit fytoplanktonu, fixace vzorků podle taxonomické skupiny a účelu*. 2006. 22 s.
- [26] KAPANEN, A., ITÄVAARA, M. Ecotoxicity Tests for Compost Applications . *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2001, vol. 49, is. 1, s. 1-16.
- [27] HÖRNSTRÖM, E. Toxicity test next term with algae—A discussion on the batch method . *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 1990, vol. 20, is. 3 [cit. 2009-05-18], s. 343-353.
- [28] BREITHOLTZ, M., et al. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment . *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2006, vol. 63, is. 2 [cit. 2009-05-19], s. 324-335.
- [29] BLANCK, H., WALLIN, G., WÄNGBERG, S.-A. Species-dependent variation in algal sensitivity to chemical compounds . *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 1984, vol. 8, is. 4 [cit. 2009-05-19].
- [30] MOREIRA-SANTOS, M., SOARES, A., RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2004, vol. 59, is. 2 [cit. 2009-05-13].
- [31] LUKAVSKÝ, J. The evaluation of algal growth potential (AGP) and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. *Water Research* [online]. 1992, vol. 26, is. 10 [cit. 2009-05-20], s. 1409-1413.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a	- hustota inokulační kultury
A_c	- růstová rychlost v kontrole
A_i	- růstová rychlost ve sledované koncentraci
BBTT	- bakteriální bioluminiscenční test toxicity
c	- požadovaná hustota řasové kultury na začátku testu v 1 ml
EPA	- agentura pro ochranu životního prostředí, Evropská policejní akademie
EU	- Evropská Unie
FDA	- fluorescein diacetát
IC ₅₀	- inhibiční koncentrace, která představuje koncentraci zkoušené látky mající za následek 50% snížení růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku
ISO	- mezinárodní organizace pro normalizaci
I_A	- inhibice integrálu biomasy
I_μ	- procento inhibice růstu
lx	- jednotka osvětlení (lux)
LABRAP	- Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution
LC ₅₀	- letální koncentrace způsobující smrt 50% testovaných organismů
mg.l ⁻¹	- jednotka hmotnostní koncentrace (miligram na litr)
ml	- jednotka objemu (mililitr)
MO	- mikroorganismus
MO _x	- průměrný počet buněk v jednom čtverci (celkem spočítaných děleno počtem čtverců)
N_0	- počet cenobií v 1 ml na počátku testu
N_l	- počet cenobií v 1 ml v čase t_l
N_n	- počet cenobií v 1 ml na konci testu (příp. v čase t_n)
O.D.	- optická hustota (optical density)
OECD	- organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
t_l	- doba prvního měření od počátku testu
t_n	- doba trvání testu
V	- množství testovaného roztoku
W.m ⁻²	- jednotka svítivosti (wat na metr čtvereční)
x	- potřebný objem inokula
X	- přepočet na 1 mm ³
y	- počet buněk mikroorganismů
z	- použité ředění
μ_c	- růstová rychlost v kontrole
μ_i	- růstová rychlost ve sledované koncentraci