

Test inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*

Úvod

Tento růstový test je modifikací OECD 201 (ISO 8692) normovaného růstového testu. Odpověď organismu na danou koncentraci látky je hodnocena ve srovnání s průměrným růstem kontroly.

Test byl optimalizován pro provedení v 96ti jamkových mikrotitračních destičkách.

Exponovaným organismem je zelená řasa *Raphidocelis subcapitata* (Syn. *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Selenastrum subcapitata*), která bude vystavena požadovaným koncentracím dvojjaderného draselného ($K_2 Cr_2 O_7$). Každá testovaná varianta bude provedena v 5 opakováních. Po zahájení a ukončení expozice je nutno změřit absorbanci (680 nm) pomocí spektrofotometru pro každou jamku a variantu. Vyhodnocení je provedeno na základě rozdílu absorbancí na konci testu a na začátku testu (KONEC-START).

Materiál a reagensie

- Řasová kultura kultivovaná ve standardním médiu (50% ZBB médium) o určité absorbanci
- Mikrodestičky, automatické pipety, špičky k pipetám, nádoby pro vyředění odpovídajících koncentrací testované látky
- Destilovaná voda, nesterilní 50% ZBB médium

Průběh experimentu:

- Příprava ředící řady:

testovanou látku $K_2 Cr_2 O_7$ vyředíme ze zásobního roztoku o konc 200 mg/L na požadované koncentrace (100, 50, 25, 12.5, 6.25 mg/L) –5 mikrozkmavek - do první přeneste 400 uL zásobního roztoku a do 4 ostatních 200 uL destilované vody (vialky popište koncentracemi) z roztoku o nejvyšší koncentraci 200mg/L přeneste 200 uL do další vialky s vodou a důkladně promíchejte (výsledná koncentrace 100mg/L), stejným způsobem připravte seriovým ředěním další nižší koncentrace

- Příprava inokula řas:

řasové inokulum vyředujeme kultivačním médiem (50% ZBB) na požadovanou hodnotu b/ml a odpovídající objem. Výchozí množství buněk /ml řasového inokula pro založení experimentu je $4 \cdot 10^5$ (přibližně odpovídající optická hustota v rozmrzí 0,03-0,04 při 680 nm). Počty buněk na ml zjistíme pomocí počítání na Bürkerově komůrce.

- Počítání na Bürkerově komůrce:

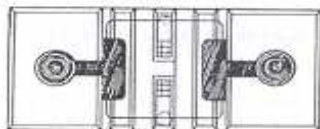
Umístění krycího skla-viz obr.2.1,2.2. Krycí sklíčko by mělo být svorkami uchyceno dostatečně pevně (duhové okraje skla kolem svorek). Ke hraně uchyceného skla přiložíme pipetu obsahující 10 μ l vzorku a lehce pouštíme-celá počítací plocha by měla být pokryta vzorkem.

Samotné počítání probíhá ve čtverci o velikosti 12*12 malých čtverečků (dvojitá čára), nebo 3*3 velkých čtverců (trojitě ohraničení) (obr.2.3-1). V našem případě budeme počítat 1 malý čtvereček v každém velkém čtverci (9)-zprůměrujeme a převedeme na plochu 1 velkého čtverce-vynásobením 16(počet malých čtverců)-dostaneme počet buněk v 0,1 μ l-násobením 10 000 –dostaneme počet buněk a 1ml. (**POZOR:**počítají se pouze buňky uvnitř čtverce nebo hraničící napravo a nahoře (viz obr 2.3-3)

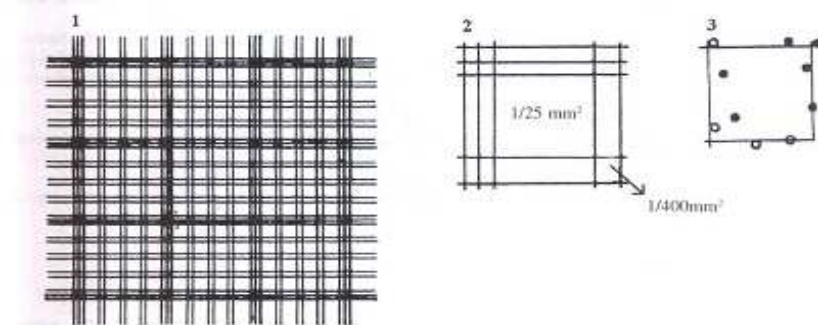
Výpočet: **(počet buněk (napočítáno)/ 9)*16* 10000)= výsledek počet buněk/ml**



Obr. 2.1. Bürkerova komůrka při pohledu ze strany



Obr. 2.2. Bürkerova komůrka při pohledu shora



Obr. 2.3. Bürkerova komůrka: 1. mřížka Bürkerovy komůrky, 2. schéma čtverečků pro červené a bílé krvinky, 3. počítané krvinky označené plnými kroužky

- Doba expozice: 3 dny
- Podmínky expozice:
 - teplota 23°C
 - osvětlení 5080 lx (použití klasické halogenové zářivky a zářivky Aqua Glo fialová, 40W)

Do jamky napipetujeme 225 μ l suspenze řas o požadované absorbanci + 25 μ l testované látky (do kontroly dáme 25 μ l destilované vody). Testovaná látka je zředěna inokulem řas 1:9 (10x) na námi požadované koncentrace.

Schéma mikrodestičky:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O				
B	H ₂ O	C1	C2	C3	C4	C5	H ₂ O	H ₂ O				
C	H ₂ O	C1	C2	C3	C4	C5	H ₂ O	H ₂ O				
D	H ₂ O	C1	C2	C3	C4	C5	H ₂ O	H ₂ O				
E	H ₂ O	K	K	K	K	K	H ₂ O	H ₂ O				
F	H ₂ O	C1	C2	C3	C4	C5	H ₂ O	H ₂ O				
G	H ₂ O	C1	C2	C3	C4	C5	H ₂ O	H ₂ O				
H	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O				

EKOTOXIKOLOGICKÉ BIOTESTY 2008, RECETOX

H ₂ O	destilovaná voda
C1	koncentrace dvojchromanu draselného 0.625 mg/L
C2	koncentrace dvojchromanu draselného 1.25 mg/L
C3	koncentrace dvojchromanu draselného 2.5 mg/L
C4	koncentrace dvojchromanu draselného 5 mg/L
C5	koncentrace dvojchromanu draselného 10 mg/L

- Měření absorbance:
Absorbanci měříme při vlnové délce 680 nm. **Před každým měřením nutno jednotlivé jamky promíchat pipetou!!!!**
Získaný soubor (ve formátu MS-Excel) uložte na pevný disk počítače do adresáře "C:/biotesty-cviceni/" pod názvem START-vaše zkratka.xls, kde zkratka je musí být jasná a dobře rozpoznatelná všem osobám ve vaší pracovní skupině.
- Mikrodestičku přikryjeme víčkem a exponujeme v inkubační místnosti s řízeným světelným režimem.

Vyhodnocení inhibice

- Po ukončení expozice spočítáme mikroskopicky (kontrolu a 2 koncentrace dvojchromanu-kolem EC50-odhadneme okem) / změříme absorbanci jednotlivých jamek ve spektrofotometru při vlnové délce 680 nm. Získaný soubor opět uložíme podobně jako předchozí soubor (C:/biotesty-cviceni/ KONEC-zkratka.xls).
- Hodnoty absorbance u kontroly zprůměrujeme a následně dosadíme veličiny dle vzorce:

$$\%I = \frac{A_K - A_v}{A_K} * 100$$

A_K průměr absorbance kontroly
A_v průměr absorbance jednotlivých variant koncentrací dvojchromanu draselného

- Výpočet EC50:
Vyneseme získanou inhibici v % do grafu v excelu. Inhibici, která se pohybuje kolem 50% vyneseme do samostatného grafu (má 2 hodnoty nad a pod 50% inhibicí), proložíme lineární regresní přímkou a dle rovnice regrese odečteme z osy x koncentraci dvojchromanu draselného, ve které došlo k 50% inhibici růstu.

Protokol k růstovému biotestu se zelenou řasou *R. subcapitata*:

Jména členů skupiny:

Datum založení expozice:

Datum hodnocení:

-> délka expozice (počet dní):

		Koncentrace (mg/L)				
	Kontrola (0)	0.625	1.25	2.5	5	10
A680 START (průměr)						
SMODCH						
Počet buněk/ml						
A680 KONEC (průměr)						
SMODCH						
Počet buněk/ml						
% inhibice						
SMODCH						
EC 50 (mg/L)						

Graf:

Závěr: