



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Testy trofie a toxicity na řasách



BM pro MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Základní přehled řasových testů:

- Testy se sladkovodními i mořskými řasami
- Testy statické, semistatické a průtočné
- Vsádkové („bach cultures“) a kontinuální kultivace
- Testy jednodruhové, dvou/třídruhové a vícedruhové
- Baterie testů se zástupci skupin (rozsivky, zelené řasy jednobuněčné, cenobiální a vláknité, sinice)



Uchovávání matečných kultur

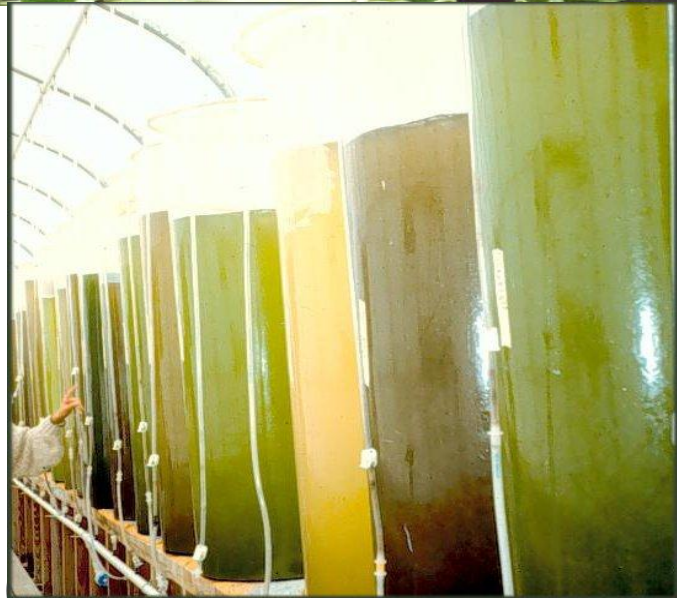
- **Klasicky:**
 - zkumavky-šikmé agary,
 - E-baňky- agar, tekutá media, „bi-fáz“
- **Alternativy**
 - Imobilizace živin
 - Speciální media
 - Lyofilizace
 - Kryo- cesta
 - Imobilizace buněk do agaru a alginátu, molitanu, PU-pěny, experlitu



- **Z agaru - mechanicky**
- **Z alginátu – princip – Ca-Na kompetice**
 - Uhličitan draselný
 - Hydrogen uhličitan sodný
 - EDTA
 - Hexametafosforečnan sodný
 - Citronan sodný
 - Vinan draselno sodný
 - Jantaran sodný



Sbírky a kultivace řas

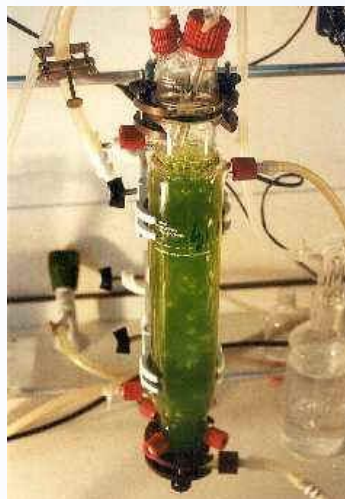


Uchovávání matečných kultur

Sbírka BU AV ČR



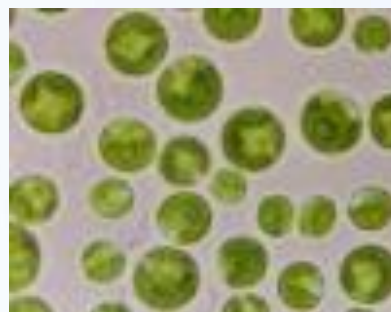
Kontinuální
kultivace



Klasické kultury



Řasy a sinice jako testovací organismy



Welcome to the CCAP Website

Click here
to view.

The Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) is the longest established of the world's major protistan service culture collections. It holds over 2000 strains of algae and protozoa which are supplied worldwide to industry and the academic community. The Collection is held at two sites:

CCAP's Freshwater Laboratory (CCAP-F) holds the Collection's freshwater algae and all protozoa. It is based at the Centre for Ecology and Hydrology (CEH) Windermere, which is an institute of the Natural Environment Research Council (NERC) situated in the English Lake District.



CCAP's Marine Laboratory (CCAP-M) holds the Collection's marine algae. It is based at Dunstaffnage Marine Laboratory (DML), which is an institute of the Scottish Association for Marine Sciences (SAMS) situated on the west coast of Scotland.

Metody používané pro EB s řasami: (dle novelizace ISO 8692/2003 a OECD 201 – nový návrh)

- *Desmodesmus subspicatus* 5×10^4
- *Pseudokirchneriella subcapitata* 5×10^3
- *Anabaena flos-aquae* 10^4
- *Synechococcus leopoliensis* 10^4
- *Navicula pelliculosa* 10^4

Zdroj – sbírky, vlastní kultury

Koncentrace inokula dle organismu a detekce



Další použitelné organismy

- *Chlorella kessleri* FOTT et NOVÁK., kmen LARG/1;
- c) *Desmodesmus subspicatus* CHOD., kmen LAPAILEUR/Camb. 276-20;
- d) *Desmodesmus quadricauda* (TURP.)BRÉB., kmen GREIFSWALD/15;
- e) *Chlamydomonas reinhardtii*. DANG., kmen UTEX 2246 137c mt+.
- Srovnání organismů viz [5]Dvořáková a kol. 1999, [6]Rojíčková a Maršálek, 1999.



Předkultivace!!!!

- Řasové inokulum pro zkoušku se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury. Inokulační kultura se nasadí k předkultivaci 3 dny před začátkem zkoušky takto:
- Do Erlenmeyerovy baňky na 150 ml se odměří živný roztok a přidá se inokulum tak, aby hustota buněk ve finální kultuře dosahovala předepsaných 10 000 v 1 ml.
- Inokulační kultura se 3 dny provzdušňuje a udržuje při světelné intenzitě 30 W/m² (6000 lx) a teplotě (26±2) C. .
- Koncentrace inokula na počátku testu by měla být co nejnižší, aby se do testu zaneslo co nejméně živin a co nejvíce buněk se rozmnožilo pod vlivem zkoušené látky, ale v praxi se řídí také detekčním limitem přístrojů používaných pro vyhodnocování testu.



Experimentální uspořádání řasových testů toxicity 1- nádoby

- **Standardní:**
 - E-baňky 250ml 100ml media, kontinuální třepání/bublání, ISO/OECD medium, $22_{\pm 2}$ °C
- **Alternativy:**
 - Zkumavky – třepané, bublané, stacionární
 - Kyvety 5-10 cm
 - Mikrodestičky – pevné/tekuté půdy, semikontinuální
 - Biosenzor s IMA



Experimentální uspořádání řasových testů toxicity 2 – kultivační podmínky

- **Světlo** –60-120 μ E/m²/s (6-9.000 lx)
- Důležité – PhAR, periodicitata
- **Teplota** 22-26°C (teplotní optimum 27°C)
- Udržování **pH** – nepřesáhne 8.5
- **Složení media**
 - N/P poměr
 - Koncentrace mikroprvků
 - Koncentrace chelatačních látek
 - Speciální media pro studie limitace živinami



- **Přímé metody**

- **Počítání buněk**

- pod mikroskopem,
- počítač částic
- Průtokový cytometr

- „cell packing volume“

- Hodnota spalného tepla v mikrokalorimetru

- C/H/N analýza – (pozor na EP)



- **Nepřímé metody**
 - OD 663, 680, 750 nm
 - Fluorescence ex 465 em 680nm
 - Změna pH
 - Inhibice fotosyntézy
 - O₂, CO₂, RUBISCO, CCD-FLIA
 - Efekty na membránách
 - Inhibice příjmu makronutrientů



A) dle integrálu biomasy

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

t_1, t_2, t_{n-1}, t_n = **časy měření**

$N_0, N_1, N_2, N_{n-1}, N_n$ = **počty buněk v jednotlivých časech**

Inhibice I_{ai} pro každou sledovanou koncentraci:
$$I_{ai} = \frac{A_c - A_i}{A_c}$$

A_c = integrál biomasy
kontrolního vzorku

A_i = integrál biomasy
sledované koncentrace



B) – Dle růstových rychlostí

Růstová rychlost se počítá podle vzorce: $\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$

N_n = počet buněk v 1 ml v závěru testu

N_0 = počet buněk v 1 ml na počátku testu

t = délka testu

Inhibice I_i pro každou sledovanou koncentraci:

$$I_i = \frac{\mu_i - \mu_c}{\mu_c}$$

μ_c = růstová rychlost kontrolního vzorku

μ_i = růstová rychlost sledované koncentrace



Kriteria validity testu

- Růstová rychlost kontroly je 1,91/d pro *Pseudokirchneriella* a 1,74/d pro *Desmodesmus* (c.v. =24%)
- pH se nezmění o více než 1,5
- Koncentrace testované látky neklesne pod 80%



Stanovení trofického potenciálu

- Trofický potenciál se určí odečtením sušiny biomasy v kontrolním vzorku od sušiny biomasy ve vzorku vody.
- Podle tabulky 1 se určí stupeň trofie.



Tabulka 1 - Klasifikační tabulka pro hodnocení trofie
 Hodnoty sušiny v mg/l.- přepočty dle konverzní křivky z OD 750

Stupeň trofie Autor stupnic e	Kataro bní	Ultraol igo	Oligo	Oligom ezo	Mezo	Mezoeu tro	Eutro	Poly	Hypert rofní
Sládeče k 1979	5	25	50	100			500	3 000	
Žáková 1986	5		50	100	200	350	500	1000	1 000



Zkouška na limitující živiny

- Stanovení trofického potenciálu je možno doplnit o zkoušku na limitující živiny.
- Vzorek vody se selektivně obohatí o P, N, P+N, popř. o další prvky,
 - vzorek (bez obohacení)
 - (konečná koncentrace fosforu 0,05 mg/l)
 - (konečná koncentrace dusíku 1 mg/l)
 - (konečná koncentrace fosforu 0,05 mg/l a dusíku 1 mg/l)
- vzorek + další prvky /koncentrace
- Roztoky se sterilizují v množství 2 ml v otevřených Petriho miskách 2 hodiny ve sterilizačním zařízení (viz příloha B). Sterilní roztoky se přelijí do sterilních lékovek.



Protokol o zkoušce

- **V protokolu o zkoušce se uvede:**
 - a) odkaz na použitou metodu;
 - b) identifikace vzorku nebo zkoušené látky;
 - c) zkušební organismus: druh, původ, kmenové referenční číslo, způsob kultivace;
- **podrobné údaje o zkoušce:**
 - 1) datum zahájení a doba trvání;
 - 2) koncentrace zkoušené látky a ředění vzorku;
 - 3) složení živného roztoku;
 - 4) kultivační zařízení a inkubační postup;
 - 5) intenzita osvětlení;
 - 6) teplota;
 - 7) metoda měření hustoty buněk, použitá konverzní rovnice;



Protokol o zkoušce 2 - Výsledky

- 1) absorbance v jamkách sérologické destičky/ebó počty buněk v každé fázi měření;
- 2) sušina biomasy v jamkách sérologické destičky ve stacionární fázi růstové křivky;
- 3) hodnoty EC50; způsob výpočtu
- 4) hodnoty trofického potenciálu;
- 5) další skutečnosti významné z hlediska užitého postupu.



Table 1.

The influence of selected compounds on the growth of *Chlorella kessleri* in different medium. 96 h EC 50 values in $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (95% confidence interval) and coefficient of determination respectively. *values in $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

STANDARD BOTTLE ASSAY		
	OECD medium	BBM medium
CdCl ₂	37.3 /26.5-48.5/ 0.73	78.1 /69.4-86.8/ 0.68
CuCl ₂	56.3 /50.5-62.1/ 0.82	83.7 /74.7-92.8/ 0.76
ZnCl ₂	54.1 /49.0-59.2/ 0.89	73.0 /67.1-78.9/ 0.86
bentazon	37.2 /33.2-41.2/ 0.92	44.6 /41.0-48.2/ 0.94
*imidazolin	78.7 /72.2-85.2/ 0.85	97.1 /88.4-105.8/ 0.84
*gluphosinate ammonium	11.3 /8.6-14.0/ 0.86	15.7 /11.5-19.9/ 0.91
MICROPLATE ASSAY		
	OECD medium	BBM medium
CdCl ₂	40.1 /30.9-49.1/ 0.89	79.6 /74.4-84.8/ 0.96
CuCl ₂	53.5 /48.3-58.7/ 0.85	78.2 /71.6-84.6/ 0.94
ZnCl ₂	54.1 /49.0-59.2/ 0.89	66.5 /61.9-71.1/ 0.94
bentazon	31.7 /28.6-34.8/ 0.97	37.8 /33.6-42.0/ 0.94
*imidazolin	81.2 /75.4-87.0/ 0.96	89.6 /86.5-92.7/ 0.94
*gluphosinate ammonium	9.2 / 6.5-11.9/ 0.98	13.6 /12.5-14.7/ 0.99
CHLOROPHYLL FLUORESCENCE ASSAY		
	OECD medium	BBM medium
CdCl ₂	47.1 /37.5-56.5/ 0.88	48.3 /42.4-54.2/ 0.86
CuCl ₂	59.0 /54.4-63.6/ 0.90	56.6 /52.0-61.2/ 0.97
ZnCl ₂	72.3 /68.0-76.6/ 0.95	70.1 /66.5-73.7/ 0.96
bentazon	13.2 /10.1-16.6/ 0.98	14.0 /11.3-16.7/ 0.98
*imidazolin	94.7 /90.5-98.9/ 0.98	96.2 /93.1-99.3/ 0.94
*gluphosi- te ammonium	10.1 / 7.4-12.8/ 0.96	9.6 / 8.5-10.7/ 0.98





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí