

BIOTESTY cvičení – JARO 2015

Obsah

ORGANIZAČNÍ POKYNY:	2
ČASOVÝ HARMONOGRAM JARO 2015:	4
BLOK 1	6
STUDIJNÍ MATERIÁL 1:	7
STUDIJNÍ MATERIÁL 2:	15
DOMÁCÍ ÚKOL B2	17
BLOK 2	19
BLOK 3	20
STUDIJNÍ MATERIÁL 3:	21
DOMÁCÍ ÚKOL B3	33
DOMÁCÍ ÚKOL B4	35
BLOK 4	36
DOMÁCÍ ÚKOL B5	37
BLOK 5	41
BLOK 6	42
STUDIJNÍ MATERIÁL 4	43
DOMÁCÍ ÚKOL B6	45
BLOK 7	46
DOMÁCÍ ÚKOL B7	47

ORGANIZAČNÍ POKYNY:

Aktuální informace vždy na:

ISu a Google_docs:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Gw-sg_zuDv_sjfeoXwAAmkmio1SUBMRqjZiObR4AiXE/edit#gid=0

Požadavky:

1. **100% docházka** (případné absence ze závažných důvodů budeme řešit individuálně)
2. Všechny odevzdané a schválené **Domácí úkoly** (celkem **6**)
3. **Prezentace** celosemestrálního projektu = souhrnného posudku o toxicitě vylosované látky (po dvojicích)

Vstup do laboratoří:

1. Poučení **BOZP – podpis**
2. **Přezůvky**
3. Plášť

Celkový průběh a smysl cvičení:

Cvičení proběhne v **7 blocích**

- **5 bloků** (blok 1-5) je vzájemně úzce propojeno – jedná se o studentský projekt – **komplexní zhodnocení toxicity vylosované látky pro vodní prostředí užitím baterie biotestů, dat z US-EPA Ecotox Database a SSD modelu.**

Představte si, že jste zaměstnání na pozici ekotoxikologa, ať už v soukromé nebo veřejné sféře, a dostali jste za úkol zpracovat kvalitní a nezávislý posudek o toxicitě a možných rizicích vaší chemické látky pro životní prostředí.

Vaše práce na tomto semestrálním projektu zahrnuje následující části:

1. Rešerše základních informací o látce
2. Laboratorní testování + zpracování výsledků (*blok 3, 4 a 5*)
3. Sestavení modelu SSD pro danou látku (*blok 1, 2 a 5*)
4. Zpracování souhrnného dokumentu – posudku o toxicitě vaší látky (*blok 5*)
5. Prezentace a diskuze (*blok 5*)

Jednotlivé bloky cvičení a především domácí úkoly vás provedou zpracováním dílčích kroků tohoto semestrálního projektu.

Studenti se rozdělí do dvojic a vylosují si 1 látku, se kterou pak celý semestr pracují. K látce shromáždí ekotoxikologická data, vytvoří model SSD, experimentálně určí toxicitu na baterii biotestů (bakterie – *Vibrio fischeri*, řasy – *Raphidocoelis subcapitata* a hrotnatky – *Daphnia magna*).

Smyslem tohoto studentského projektu je vyzkoušet si práci blízkou praxi, jejímž obsahem je posoudit toxicitu jedné látky napříč několika biotesty, naučit se pracovat s ekotoxikologickými

databázemi, vytvořit model SSD a souhrnně interpretovat všechny výsledky celosemestrální práce.

Výstupem jsou **4 domácí úkoly + 1 desetiminutová prezentace**

Vedou Dr. Jiří Novák, Mgr. Soňa Smetanová, Mgr. Zuzana Toušová a Mgr. Petr Masner, Mgr. Eliška Sychrová

- **2 bloky** (blok 6 a7) proběhnou jako zcela nezávislá laboratorní úloha – **kontaktní půdní test toxicity s chvostoskoky *Folsomia candida*.**

Výstupem budou **2 domácí úkoly**. Vede Mgr. Jana Vašíčková.

ČASOVÝ HARMONOGRAM Jaro 2015:

Ekotoxikologické biotesty cvičení - Harmonogram semestru Jaro 2015:									
týden	den	datum	hodiny rozmezí	hodiny trvání	rozdělení	aktivita	učebna/lab	co se bude dít	
1	16.2-22.2	-	-	-	-	-	-	-	-
2	23.2.-1.3.	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2.3.-8.3.	-	-	-	-	-	-	-	-
4	9.3.-15.3	ST	11.3.	8:30 před začátkem přednášky	30 min	všichni studenti	domluva se studenty	RCX-1	domluva na termínech bloků
5	16.3.-22.3.	ST	18.3.	13-15	2h	všichni studenti	BLOK 1	RCX-2	úvod do celosemestrální práce, SSD, ECOTOX databáze, zadání úkolu B2, B3, B6
6	23.3.-29.3.	PO	23.3.	23:59	-	každý za sebe	odevzdání úkolu B6	-	-
		ST	25.3.	11.13	2h	všichni studenti	BLOK 6	1S25	založení testu s chvostoskoky
		ČT	26.3.	23:59	-	1 řešení za dvojici	odevzdání úkolu B3	-	-
7	30.3.-5.4.	PO-PÁ	30.3.-5.4.	rozpis viz podrobná tabulka	1.5h + 1h	1.5h všichni + 1h po skupinách	BLOK 3	RCX-2 + lab	Instruktaž vyhodnocení Graphpad, laboratorní cvičení akvatické biotesty - mikrotox, řasy, dafnie; zadání úkolu B4
		NE	5.4.	23:59	-	každý za sebe	odevzdání úkolu B2	-	-
8	6.4.-12.4.	ČT	9.4.	23:59	-	1 řešení za dvojici	odevzdání úkolu B4	-	-
9	13.4.-19.4.	PO	13.4.	14-16	2h	všichni studenti	BLOK 4	RCX-2	společná konzultace vyhodnocení výsledků experimentů z bloku 3, zadání úkolu B5
		ST	15.4.	13-15	2h	všichni studenti	BLOK 2	RCX-2	ETX software
10	20.4.-26.4.	ČT	23.4.	9.11	2h	všichni studenti	BLOK 7	1S25	ukončení testu s chvostoskoky, zadání úkolu B7
11	27.4.-3.5.	ČT	30.4.	23:59	-	1 řešení za dvojici	odevzdání úkolu B5	-	-
12	4.5.-10.5.	ČT	7.5.	23:59	-	1 řešení za dvojici	odevzdání úkolu B7	-	-
		PO-ČT	4.5.-7.5.	8-16:30	-	-	opravy a konzultace	-	opravy úkolu B5 a případné individuální konzultace v průběhu týdne - po domluvě: tousova@recetox.muni.cz
13	11.5.-17.5	PO	11.5.	16-17:30	1.5h	všichni studenti, prezentace po dvojicích	BLOK 5	RCX-2	závěrečná prezentace celosemestrálních projektů
14	18.5-24.5.	-	-	-	-	-	-	-	-

Časový rozvrh skupin pro týden B3: 30.3.-5.4.					
PO	30.3.	12:00-13:00	13:00-14:00	14:00-15:30	15:30-16:30
		SK1 (lab 325)	SK2 (lab 325)	RCX-2 všichni	SK3 (lab 325)
ÚT	31.3.	12:30 - 14:00	14:00-15:30	15:30-17:00	
		D (lab 1S22)	A (lab 321)	M (lab 325)	A=Algae
		M (lab 325)	D (lab 1S22)	A (lab 321)	D=Daphnia
		A (lab 321)	M (lab 325)	D (lab 1S22)	M=Microtox
ST	1.4.	12:30-12:50	12:50-13:10	13:10-13:30	13:30-13:50
		D (lab 1S22)	A (lab 321)		
		A (lab 321)	D (lab 1S22)	D (lab 1S22)	A (lab 321)
ČT	2.4.	každá dvojice individuálně - cca 40 min			
PÁ	3.4.	každá dvojice individuálně - cca 20 min			

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3
1	Tomáš Cimr	Luděk Sehnal	Lucka Čtveráčková
2	Filip Urbánek	Aneta Kopecká	Anna Segečová
	<i>dodine</i>	<i>chlorpyrifos</i>	<i>nickel</i>
3	Renata Skovroňová	Zuzka Dvořáková □	1 skupina - jsou 2 dvojice
4	Alena Lungová	Jakub Tříška	
	<i>atrazine</i>	<i>triclosan</i>	

BLOK 1

Termín: **ST 18.3.2015: 13-15:(30)** - max 2.5h v RCX-2

Obsah:

Species sensitivity distribution - teoretický úvod

Práce s US EPA Ecotox databází - prakticky na počítačích

Zadání domácího úkolu B2

Příprava na blok 1:

Přečíst - STUDIJNÍ MATERIÁL 1: **Metoda rozložení citlivosti druhů (Species Sensitivity Distribution; SSD)**; (Str.7)

Přečíst - STUDIJNÍ MATERIÁL 2: **Návod na tvorbu SSD modelů**; (Str. 15)

Úkoly navazující na blok 1:

DOMÁCÍ ÚKOL B2 (zadání na str. 17) s termínem odevzdání **do neděle 5.4.2015** na zuzana.tousova@seznam.cz

STUDIJNÍ MATERIÁL 1:

Metoda rozložení citlivosti druhů (Species Sensitivity Distribution; SSD)

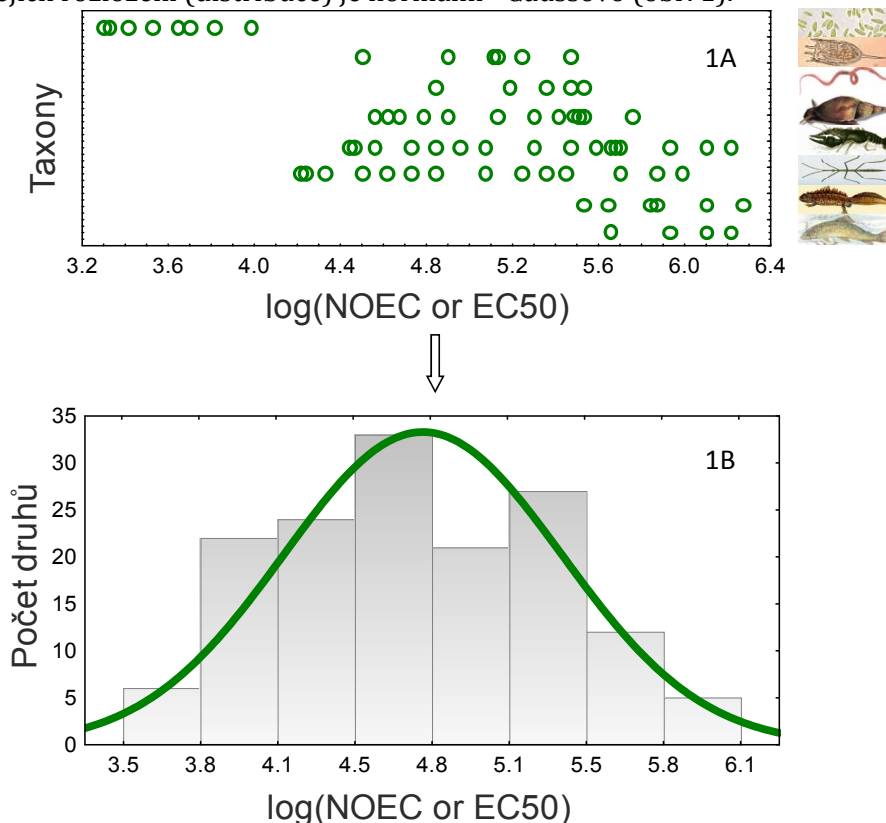
Mgr. Soňa Smetanová, RECETOX, 2013

1. Úvod do SSD

SSD model byl poprvé představen v roce 1989, ale všeobecné známosti se dočkala až s rozvojem výkonnějších počítačů (kolem roku 2000). Je hojně využíván pro hodnocení účinků a rizik toxických látek v ekosystémech a pro stanovení limitů toxických látek v prostředí a uplatňuje se ve směrnicích EU (např. v rámcové směrnici o vodách).

Model je založen na předpokladu, že různé druhy organismů žijící v určitém ekosystému (např. řeka, jezero či půda) jsou různě citlivé na určitou toxickou látku (např. koryš *Daphnia magna* je na rozdíl od řasy *Raphidocelis subcapitata* velmi citlivý na insekticidní látku chlorpyrifos). Tyto citlivosti jsou vyjádřeny nejčastěji jako NOEC či EC50 hodnoty.

Základním předpokladem SSD je, že pokud se vezmou citlivosti (**logaritmy** NOEC či EC50 hodnot) všech druhů organismů (žijících v daném ekosystému) na určitou toxickou látku, pak jejich rozložení (distribuce) je normální - Gaussovo (obr. 1).



Obr. 1. Princip SSD

1A: Různé druhy jsou různě citlivé na toxickou látku (tj. mají různé hodnoty NOEC či EC50). Citlivost se může výrazně lišit mezi druhy a také mezi vyššími taxonomickými skupinami (zde jsou například nejvíce citlivé řasy a naopak nejméně citliví jsou obratlovci – ryby a obojživelníci); zelená kolečka značí různé druhy organismů, osa y značí různé taxonomické skupiny.

1B: Distribuce (rozložení) těchto citlivostí (resp. logaritmů EC50 nebo logaritmů NOEC hodnot) má vlastnosti rozložení normálního (Gaussova); sloupce značí počet druhů s daným rozmezím logEC50 (či logNOEC) hodnot, zelená čára označuje proložení Gaussovou funkcí.

Toto rozložení je symetrické a definované pouze dvěma parametry – aritmetickým průměrem a směrodatnou odchylkou a proto je velmi jednoduché s ním pracovat (rovn. 1 a 2, obr. 2):

Rovnice pro výpočet aritmetického průměru μ a směrodatné odchylky σ pro SSD:

$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

(1)

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}$$

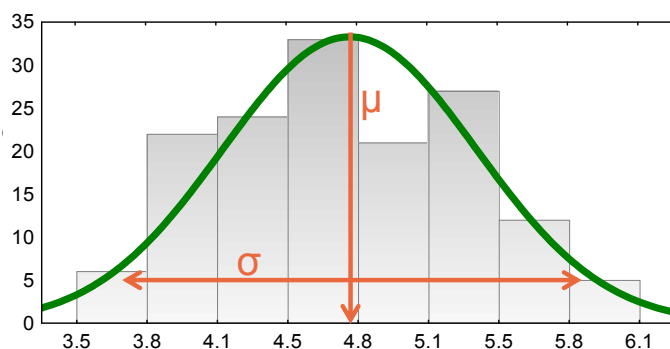
(2)

μ ... aritmetický průměr

σ ... směrodatná odchylka

n ... celkový počet druhů

x_i ... sensitivita i-tého druhu (logEC50 či logNOEC hodnota) na konkrétní toxickou látku



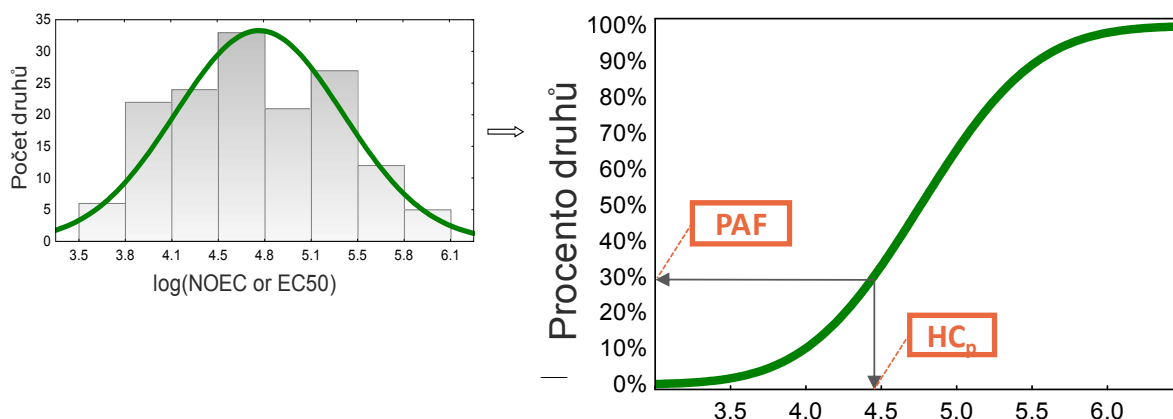
Obr. 2. Parametry normálního (Gaussova) rozložení

Směrodatná odchylka (σ) popisuje míru variability dat a aritmetický průměr (μ) jejich střední hodnotu

Výše popsané Gaussovo rozložení se dá vyjádřit také jako kumulativní distribuční funkce (ukazuje totéž s tím rozdílem, že na ose y nejsou četnosti druhů s danou kategorií citlivosti, ale procento organismů s danou nebo vyšší citlivostí (např. danou nebo nižší hodnotou EC50). A z této kumulativní distribuční funkce se mohou lehce vypočítat hodnoty HC_p či PAF (obr. 3).

HC_p (Hazard Concentration for p-percent of species) je taková koncentrace dané toxické látky, která podle SSD modelu negativně ovlivní p-procent druhů organismů (například HC_{15} metanolu je taková koncentrace metanolu, která má negativní efekt na 15 % všech druhů organismů žijících v jednom ekosystému).

Oproti tomu PAF (Potentially Affected Fraction) označuje frakci (nebo procento) organismů, která bude negativně ovlivněna působením určité koncentrace dané toxické látky (tudíž při působení metanolu v koncentraci rovné HC_{15} bude PAF rovno 15 %).



Obr. 3. Zobrazení SSD jako kumulativní distribuční funkce a odvození PAF (Potentially Affected Fraction) a HC_p (Hazard Concentration for p percent of species). Oba tyto údaje se tedy týkají stejné věci (negativní efekt na různě velkou část druhů), ale popisují ji z opačných konců.

HC_p se používá pro prospektivní analýzu rizik, a sice pro stanovení PNEC (Predicted no-effect concentration) limitů – maximálních koncentrací toxických látek, které ještě nebudou mít významné negativní účinky na ekosystémy. V Evropě byla dohodnuta tato hranice na 5 %. Limitní „bezpečná“ koncentrace určité toxické látky v životním prostředí je tedy taková, která negativně ovlivní 5 % druhů a je označována jako HC_5 .

Stanovení PNEC hodnot SSD metodou má oproti ostatním metodám výhodu v menších nejistotách (limit odvozujeme za použití velkého množství taxonů a druhů, nejen z otestování tří standardních organismů, jak tomu je v případě klasických postupů). Proto i faktory nejistoty (Assessment factors) aplikované na hodnoty HC_5 pro získání PNEC hodnot jsou řádově nižší (tab. 1).

Tab. 1. Faktory nejistoty, kterými musí být poděleny maximální „bezpečné“ zjištěné koncentrace látek pro získání PNEC hodnot; tyto faktory se liší podle zvolené metody. (tabulka převzata z guidance dokumentu EU CIS-WFD No. 27 pro stanovení norem environmentální kvality).

Available data	Assessment factor
At least one short-term L(E)C50 from each of three trophic levels (fish, invertebrates (preferred <i>Daphnia</i>) and algae) (i.e. base set)	1000 ^{a)}
One long-term EC10 or NOEC (either fish or <i>Daphnia</i>)	100 ^{b)}
Two long-term results (e.g. EC10 or NOECs) from species representing two trophic levels (fish and/or <i>Daphnia</i> and/or algae)	50 ^{c)}
Long-term results (e.g. EC10 or NOECs) from at least three species (normally fish, <i>Daphnia</i> and algae) representing three trophic levels	10 ^{d)}
Species sensitivity distribution (SSD) method	5-1 (to be fully justified case by case) ^{e)}
Field data or model ecosystems	Reviewed on a case by case basis ^{f)}

Hodnoty PAF se naopak používají pro kvantitativní zhodnocení ekotoxikologického stavu ekosystému (tj. pro retrospektivní analýzu rizik). Po změření koncentrace určité toxické látky (např. v řece) se aplikuje model SSD a vypočítá se hodnota PAF. Výstupem je nejen informace, jestli tato hodnota přesáhla onen stanovený limit 5 %, ale také informace o míře poškození (např. látka A mající PAF = 6 % sice přesahuje limit, ale rozhodně páchá méně škod než látka B

s PAF = 62 %), což je opět velká výhoda oproti tradičnímu hodnocení, které je pouze kvalitativní („koncentrace látky v prostředí je pod/nad PNEC hodnotou“).

SSD je tedy statistický model velice vhodný pro hodnocení ekotoxikologických rizik a účinků toxických látek v prostředí. V následující kapitole se dozvíme, jaká vstupní data musíme mít, abychom takový model mohli vytvořit.

2. Ekotoxikologická data vhodná pro SSD

Jak je již zmíněno výše, vstupními daty pro vytvoření SSD modelu jsou nejčastěji hodnoty NOEC či EC50. Původně byly využívány spíše hodnoty NOEC, které označují takovou koncentraci látky, která nemá statisticky významný chronický účinek na organismy. Pokud se vytvoří SSD model z NOEC hodnot, pak např. PAF = 5 % tedy znamená, že 5 % druhů je chronicky ovlivněno „více než nevýznamně“. V poslední době se ovšem od používání NOEC hodnot všeobecně upouští a proto se stále více i v SSD modelech využívají akutní EC50 hodnoty. EC50 je taková koncentrace látky, která akutně způsobuje 50% efekt na organismech. Pokud se vytvoří SSD model z EC50 hodnot, pak např. PAF = 5 % znamená, že 5 % druhů je akutně ovlivněno „minimálně z padesáti procent“. Tyto rozdíly si je nutné vždy uvědomit. V následujícím textu již bude vše vysvětlováno na příkladu použití akutních EC50 hodnot.

Data ekotoxicity se nejčastěji získávají z online databází (např. US EPA ECOTOX: <http://cfpub.epa.gov/ecotox> či IUCLID Chemical Data Sheets: <http://esis.jrc.ec.europa.eu>) a publikovaných vědeckých článků. Není tedy třeba další testování organismů, což je výhodné jak z hlediska ochrany organismů, tak finančně a časově.

Pouhé použití všech (nezkontrolovaných) EC50 hodnot z online databází pro tvorbu SSD modelu však může vést k velkému zkreslení a proto je nutná jejich kontrola a přebrání. Databáze vhodná pro tvorbu SSD modelu akutních toxických účinků určité látky na sladkovodní druhy může vzniknout například následujícím postupem:

- Stažení základní databáze EC50 (včetně LC50 a IC50) hodnot pro všechny sladkovodní druhy z US EPA ECOTOX online databáze.¹
- Výběr pouze akutních EC50 hodnot (obvykle se používají EC50 hodnoty získané z testů s délkou expozice 1-4 dny či 1-7 dní).²
- Výběr pouze vhodných akutních efektů, které mají přímý vliv na změnu abundance a složení společenství organismů (např. efekty na růst a biomasu rostlin a mortalita a imobilizace u živočichů).³
- Výběr pouze takových EC50 hodnot, které byly odvozeny z testování čistých látek, ne směsných produktů (důležité zejména v případě pesticidů). Rozumná hranice čistoty je 90%.

Důležitá je také kontrola a odstranění opakujících se stejných záznamů v databázi (replikací) a významně podezřelých EC50 hodnot. Například pokud se v databázi vyskytuje deset různých EC50 pro druh *Daphnia magna* (od různých autorů), které mají hodnotu kolem 5 µg/l a jednu EC50 o hodnotě 1000 µg/l, pak je nutné se nad touto podezřele vysokou hodnotou zamyslet. Doporučuje se nahlédnout do vědeckého článku, ze kterého byla hodnota do databáze vložena a po úvaze ji buď z databáze vypustit, opravit nebo ji tam ponechat.

V dalším kroku je nutné v databázi přepočítat všechny hodnoty EC50 na stejné jednotky (obvykle µg/l).

¹ V případě tvorby SSD modelu chronických toxických účinků se používají NOEC, LOEC a EC10 hodnoty.

² V případě tvorby SSD modelu chronických toxických účinků se používají naopak chronické NOEC, LOEC a EC10 hodnoty.

³ V případě tvorby SSD modelu chronických toxických účinků se může použít i změna reprodukce.

Protože do SSD modelu vstupují druhové hodnoty EC50 (vždy pouze jedna EC50 pro jeden druh), je také potřeba rozhodnout, co udělat v případě přítomnosti více hodnot pro jeden druh. Obecně jsou používány dva postupy – buď se pro daný druh použije ta EC50, která má nejnižší hodnotu nebo se použije geometrický průměr všech EC50 hodnot pro tento druh. Tento krok významně ovlivní výsledek i smysl celého SSD modelu a proto je vždy důležité uvážit výběr správného postupu a uvést ho spolu s výsledky.

3. Tvorba SSD modelu

Když máme vytvořenou databázi vhodných EC50 hodnot pro určitou toxickou látku, pak můžeme vytvořit SSD model a použít ho pro predikci efektů látky na ekosystém a pro odvození limitních koncentrací (PNEC hodnot).

Za tvorbou modelu se skrývá (jak již vyplývá z předchozího textu) statistika. Naštěstí není důvod k velkým obavám těch, kteří s ní velkou zkušenost nemají, protože existuje software vytvořený přímo za tímto účelem. Jmenuje se ETX 2.0 a je zdarma ke stažení. Více o práci s tímto softwarem bude vysvětleno ve cvičení. Zde bude následovat především stručné vysvětlení teorie.

3A. Základní princip tvorby SSD modelu:

- Data z připravené databáze se zobrazí jako histogram (tj. zobrazení jejich četností) a proloží se Gaussovou (normální) distribuční funkcí. Rovnice hustoty Gaussovy distribuční funkce je:

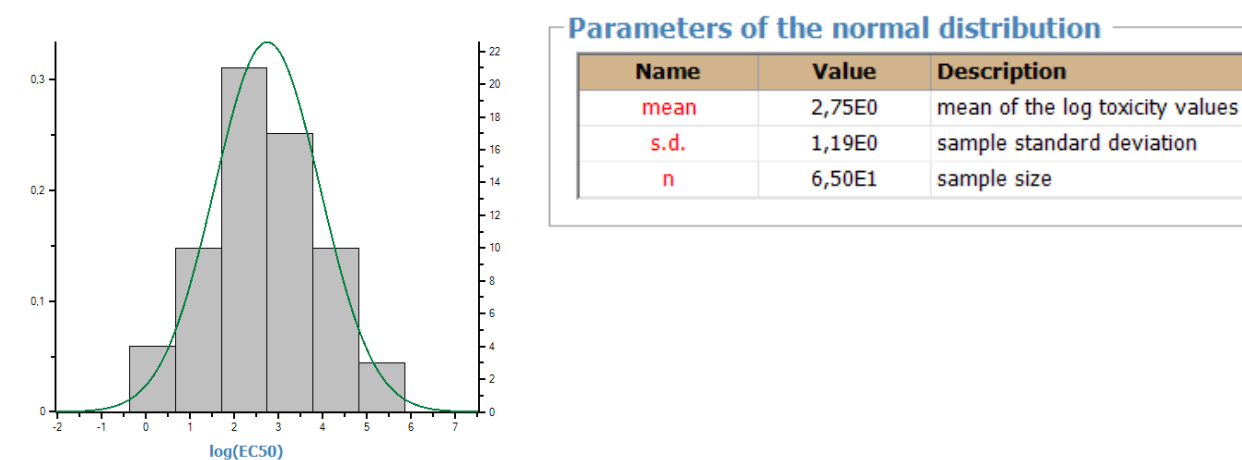
$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (3)$$

μ ... aritmetický průměr Gaussovy distribuční funkce

σ ... směrodatná odchylka Gaussovy distribuční funkce

x ... hodnota na ose x (v našem případě $\log(\text{EC50})$), pro kterou funkce vypočítá hustotu pravděpodobnosti $f(x)$

Toto proložení je vlastně základní SSD model s potřebnými parametry μ (průměr) a σ (směrodatná odchylka)



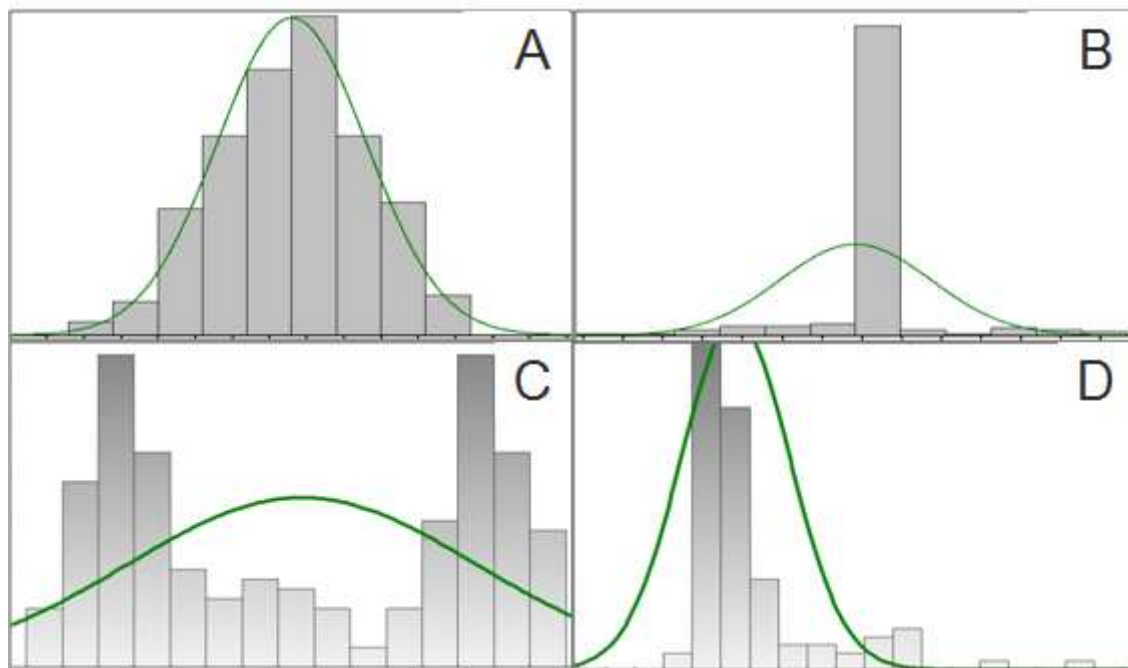
Obr. 4. Proložení histogramu $\log(\text{EC50})$ hodnot pro insekticid karbofuran Gaussovou hustotní distribuční funkcí v softwaru ETX 2.0, parametry této funkce a celkový počet hodnot v databázi.

Graf: na pravé ose y jsou četnosti jednotlivých kategorií hodnot $\log(EC50)$, na levé pak jejich hustoty pravděpodobnosti - $f(\log(EC50))$.

- V dalším kroku bychom si měli ověřit, zdali proložení četností $\log(EC50)$ hodnot touto Gaussovou funkcí je smysluplné. K tomu nám slouží tzv. testy normality. Pro SSD se nejčastěji využívá Anderson-Darling nebo Kolmogorov-Smirnov test. Zjednodušeně řečeno tyto testy porovnávají, jak moc se rozložení četností prokládaných hodnot (sloupce v histogramu na obr. 4) liší od rozložení „modelově normálního“ (zelená křivka na obr. 4). Pro jejich bližší pochopení je možné prostudovat některou z početných statistických učebnic a jiných zdrojů. Nicméně jejich výpočty jsou zahrnuty v téměř všech statistických softwarech včetně ETX 2.0. Důležité je však dodat, že data se od normálního rozložení statisticky významně neliší, pokud je výsledkem takovýchto testů hodnota $p \geq 0,05$.

Pokud je tato hodnota nižší, je vhodné se podívat na histogram a opticky a selským rozumem posoudit, jestli jsou rozdíly opravdu tak markantní nebo zda-li se jedná pouze o přílišnou „přísnost“ testů normality (ke kterému může dojít, pokud je v databázi velké množství dat). Pro takové optické posouzení mohou posloužit i tzv. Q-Q ploty či P-P ploty. Důležité je všimnout si nesymetričnosti v histogramu a přítomnosti „dvojitých“ vrcholů (obr. 5).

Pokud i optické posouzení potvrdí, že data opravdu normální nejsou, je nutné se zamyslet nad možným důvodem a případné výsledky vycházející z takového SSD modelu brát s rezervou.



Obr. 5. Normální rozložení (zelená křivka) versus rozložení dat (šedé sloupce): Rozložení dat je normální (A), nenormální s příliš vysokou četností středních hodnot (B), nenormální se dvěma vrcholy (C), nenormální nesymetrické (D)

Nyní, když je sestaven SSD model, může být použit pro výpočet HCp a PAF hodnot.

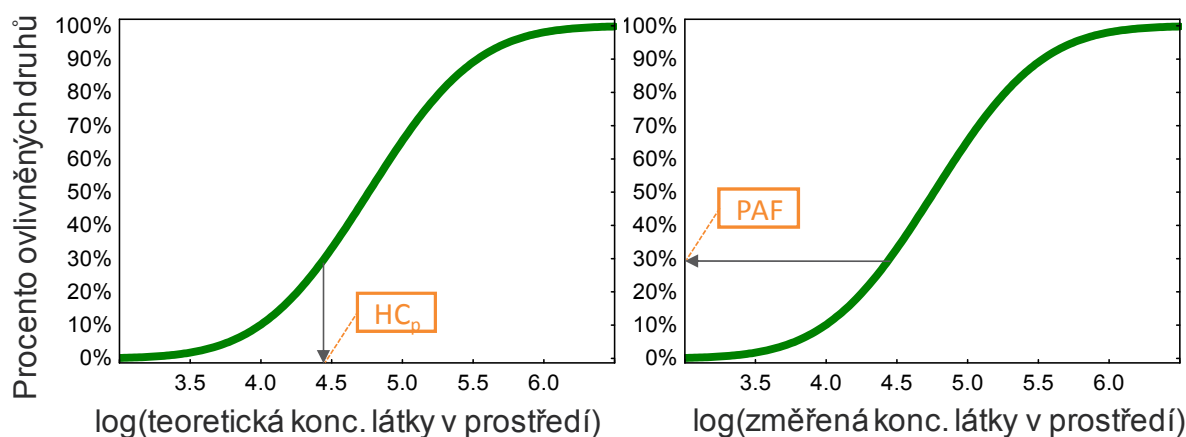
3B. Výpočet HCp a PAF:

Pro výpočet hodnot HCp a PAF nám tedy stačí znát pouze průměr a směrodatnou odchylku SSD modelu. Samotný model však musí být vyjádřený (jak je již uvedeno výše) jako kumulativní Gaussova distribuční funkce:

$$F(x) = \int_{-\infty}^x \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(t-\mu)^2}{2\sigma^2}} dt$$

(4)

Je důležité si uvědomit, že pro účel následujících výpočtů hodnoty na ose x přestávají mít význam $\log(\text{EC}_{50})$, ale jsou chápány buď jako logaritmy koncentrace studované toxické látky v prostředí (v případě odvozování hodnot PAF) nebo jako „koncentrace způsobující daný efekt na společenství organismů“ (v případě odvozování hodnot HCp).



Obr. 6. Různý význam osy x při odvození HCp a PAF hodnot

Výpočet HCp a PAF hodnot z uvedeného vzorečku není úplně triviální, naštěstí lze opět využít softwaru ETX 2.0 (jedním z jeho základních výstupů je hodnota HC₅ i s intervaly spolehlivosti) a také Excelu. Tam existuje funkce „NORMDIST“ pro výpočet PAF a funkce „NORMINV“ pro výpočet libovolné hodnoty HCp. Jediné, co stačí znát je zmiňovaný průměr a směrodatná odchylka SSD modelu pro danou toxickou látku.

4. Limitace a modifikace SSD metody

Uvedená stručná teorie a postup tvorby základního SSD modelu jsou nutné k pochopení principů této metody. Praxe je však ještě o něco složitější.

Pro tvorbu modelu z dat sensitivity organismů se nepoužívá pouze vysvětlená Gaussova distribuce, ale častá je například distribuce logistická, trojúhelníková a jiné. V poslední době se navíc začínají uplatňovat i neparametrické techniky či Bayesovská statistika. V poslední době se také čím dál víc začíná diskutovat o různých limitacích či omezeních této metody. Např. není zcela prokázáno, že limit HC₅ je opravdu dostatečně bezpečný, aby nebyl poškozen ekosystém. Dále se neustále hledá minimální počet hodnot druhových sensitivit pro danou toxickou látku (např. EC₅₀), který je dostatečný pro tvorbu nezkrslujícího SSD modelu (EU doporučuje alespoň 10 druhových hodnot z různých taxonomických skupin). V neposlední řadě se vede i diskuze nad tím, že specificky působící látky (např. herbicidy či insekticidy) jsou výrazně toxické pouze pro určité taxony a jiné taxony by měly být víceméně necitlivé. Proto je často narušena normalita takového rozložení a kvalitní SSD model je těžko vytvořitelný. Často se proto tvoří

model jen z cílových taxonů (např. SSD křivka pro herbicid glyfosát pouze z primárních producentů). Výstupy z tohoto modelu pak mají samozřejmě i jinou interpretaci. SSD modely se mohou dále používat nejen pro hodnocení účinku jednotlivých látek, ale i pro hodnocení účinků celých směsí.

Všechny tyto „nadstavbové“ informace jsou k nalezení v níže uvedené literatuře, která je zatím všechna pouze v anglickém jazyce.

Doporučená literatura pro hlubší zájemce o téma:

Posthuma L, Traas TP, Suter GW (2002) Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis, Boca Raton

EC (2011) Technical guidance for deriving environmental quality standards. Guidance Document No. 27:204

... a vědecké články (např. na Web of Science) ...

STUDIJNÍ MATERIÁL 2:

Návod pro tvorbu základních Species Sensitivity Distribution (SSD) modelů

ČÁST A: Tvorba databáze

1. Otevřete si online databázi <http://cfpub.epa.gov/ecotox/> . Zde jsou dvě možnosti na výběr, zvolte tu složitější a sice "Advanced Database Query".
2. Proklikajte si všechny záložky a postupně zadejte látku, pro kterou vytváříte SSD model (nejlépe dle CAS čísla), endpointy, které vás zajímají (EC50/ED50, LC50/LD50, IC50/ID50, NR) apod. Můžete si také filtrovat, od jakého roku chcete údaje vyhledávat.
3. Nakonec si zvolte formát, v jakém chcete databázi prohlížet (velmi vhodný je Excel).
4. Klikněte na "Perform Query for Aquatic Data" (pracujeme s akvatickým ekosystémem).
5. Po otevření Reportu ve formátu Excel si všechny sloupce prohlédněte. Pro rozšíření zkratk si otevřete a použijte "Code List" (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/blackbox/help/codelist.pdf>).
6. Postupně si odfiltrujte nežádoucí hodnoty (jako průvodce vám poslouží teoretický výukový materiál a vyučující).
7. ! Nezapomeňte převést všechny hodnoty na stejné jednotky!
8. Po vytvoření databáze vhodné pro použití pro tvorbu SSD modelu je ještě potřeba vyřešit problém s více údaji pro jeden druh. Ze dvou možností uvedených v teoretickém výukovém materiálu použijeme možnost zprůměrování těchto údajů. Vytvořte si tak novou tabulku, ve které bude uveden vždy pouze druh, rozmezí expozičních dob a geometrický průměr hodnot EC50 pro tento druh (Excelovský vzorec "geomean").
9. Hodnoty z této nové tabulky mohou být použity pro tvorbu SSD modelu.

POMOCNÝ NÁVOD PRO PRÁCI S ECOTOX DATABÁZÍ V EXCELU

Přidejte k tabulce 4 nové sloupce (např. "Opakovaný údaj", "Podezřelý údaj" a "Čistota" a "Poznámky")

Horní řádek se dá zafixovat pomocí příkazu: "zobrazení → ukotvit příčky → ukotvit horní řádek"

Filtrování se nastaví pomocí: "Data → Filtr"

Pro práci s databází (zjištění významu zkratk) si otevřete:

<http://cfpub.epa.gov/ecotox/blackbox/help/codelist.pdf>

Sloupce, které nás příliš nezajímají a můžeme je skrýt (klikneme pravým tlačítkem na sloupec a z nabídky vybereme "skrýt":

- Species Common Name
- Chemical Analysis
- Test Location
- Response Site
- Response Site Description
- Všechny "BCF" sloupce
- Trend
- Všechny "Effect Percent Mean" sloupce
- Všechny "Conc 2 Type" a "Conc 3 Type" sloupce
- Oba "Application Rate" sloupce

- Statistical Significance
- Všechny "Significance Level" sloupce

Sloupce, podle kterých se vybírají data do SSD databáze:

- Sloupec „Exposure Type“ : Environmentálně relevantní typ expozice (tedy **NE** např. gavální, injekční, intraperitoneální apod)
- Všechny sloupce „Observed Duration (Days)“ : Hodnoty z akutních testů toxicity : **1-7 dní**
- Sloupec „Endpoint“: **EC50/IC50/LD50/ED50/LC50**
- Sloupce „Effect“ a „Effect Measurement“ : Efekty s přímým vlivem na změnu abundance a složení společenství organismů (**intoxikace, mortalita, efekty na populaci, u primárních producentů i efekty na růst a fyziologické efekty jako změna fotosyntézy nebo fixace dusíku; zvažte také vliv na reprodukci – konkrétně efekt „GREP“**)
- Sloupec „Conc 1 Type (ug/L)“ : Hodnoty z testů prováděných s čistou látkou (tzn. všechny údaje značené "A" , u údajů značených "F" je nutné čistotu látky dohledat v online databázi - **OK je čistota látky 90% a víc, NESMÍ se používat data získaná testováním přípravků jako např. FURADAN apod., naopak technický karbofuran použít lze**)

V dalším kroku převed'te všechny koncentrace na stejné jednotky (sloupec Conc 1 Units (Standardized)) a označte podezřelé (odlehlé) a opakující se údaje.

Nakonec "odfiltrovanou tabulku", ve které jsou viditelná pouze správná data celou zkopírujte do nového listu. Ta již bude obsahovat pouze správná data a bude se používat pro výpočet průměrných druhových EC50 hodnot, které se použijí pro tvorbu SSD.

Na co si dát pozor:

- Dejte pozor na hodnoty koncentrace uvedené jako „<“ či „>“ (např EC50 < 25 ug/l). Tyto hodnoty jsou „nic neříkající“ a nepoužívají se! (sloupec „Conc 1 Op (ug/L)“)
- Pokud je hodnota koncentrace uvedena jako rozmezí (min-max), použijte průměr těchto dvou hodnot
- Pokud jsou některé z uvedených důležitých údajů neznámé („NR“), měli byste najít původní článek a tyto údaje dohledat a do tabulky doplnit

ČÁST B: Tvorba modelu

1. Otevřete si program ETX 2.0.
2. Zkopírujte do "Input toxicity data" vaše hodnoty z tabulky a klikněte na šipku.
3. Program za vás udělá všechny výpočty a vytvoří model. Postupně si (s vyučujícím) projděte výstupy, abyste věděli, co znamenají.
4. Zaměřte se na testy normality a na to, co vám řekli.
5. Seznamte se také s možností barevného značení různých taxonů a výhodami, které to skýtá.
6. Hodnoty HC₅ jsou poskytnuty přímo ETX programem. Výpočet hodnot PAF je zde však složitější a proto si otevřete Excel a vyzkoušejte si funkci NORMDIST. Jako průměr a směrodatnou odchylku zadejte hodnoty získané ETX softwarem. Koncentraci, která na ekosystém působí si zvolte podle svého uvážení. Hrajte si s různými hodnotami.
7. Zamyslete se nad celým postupem, nad výsledky a jejich interpretací a nebojte se ptát !

DOMÁCÍ ÚKOL B2

Vyhledávání ekotoxikologických dat v databázi US-EPA ECOTOX Database

Cíl úkolu B2: Cílem úkolu je vytvořit soubor dat v MS Excel, který obsahuje relevantní ekotoxikologická data extrahovaná z databáze US -PA ECOTOX k látce **karbofuran, CAS 1563-66-2**. Tento soubor dat bude v následujícím bloku cvičení využit k tvorbě SSD modelu v softwaru ETX 2.0.

Vypracovat do: 3 vypracované tabulky v MS Excel (stejně jako ve vzorovém příkladu) pošlete **do neděle 5.4.2015** na zuzana.tousova@seznam.cz

Přesné zadání úkolu:

1. Vytvořte databázi v Excelu pro **KARBOFURAN (CAS 1563-66-2)** tak, aby šla použít pro tvorbu SSD modelu.

A. S využitím databáze US-EPA ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) a toho, co jste se naučili ve cvičení, vytvořte takovou databázi pro karbofuran, která bude obsahovat pouze:

EC50/IC50/LD50/ED50/LC50 hodnoty z akutních testů toxicity (**1-7 dní**), pro efekty, které mají přímý vliv na změnu abundance a složení společenství organismů (**intoxikace, mortalita, efekty na populaci, u primárních producentů i efekty na růst a fyziologické efekty jako změna fotosyntézy nebo fixace dusíku; zvažte také vliv na reprodukci – konkrétně efekt „GREP“**). Typ expozice musí být environmentálně relevantní (tedy **NE** např. gavální nebo injekční apod.) a hodnoty **MUSÍ** pocházet z testů prováděných s čistou látkou (**čistota karbofuranu 90% a víc, NESMÍ se používat data získaná testováním přípravků jako např. FURADAN apod.; naopak technický karbofuran použít lze**).

Přehled kódů (zkratk) užívaných v databázi najdete na <http://cfpub.epa.gov/ecotox/blackbox/help/codelist.pdf>.

- Dejte pozor na hodnoty uvedené jako „<“ či „>“ (např EC50 < 25 ug/l). Tyto hodnoty jsou „nic neříkající“ a nepoužívají se!
- Pokud je hodnota uvedena jako rozmezí (min-max), použijte průměr těchto dvou hodnot
- Také nezapomeňte správně převést všechny hodnoty na správné jednotky na **µg/l!**
- Pokud jsou některé z uvedených důležitých údajů neznámé („NR“), měli byste najít původní článek a tyto údaje dohledat a do tabulky doplnit

B. Hodnoty ve vzniklé databázi zkontrolujte a do nového sloupce označte duplicitní nebo podezřelé hodnoty, které nebudete pro SSD model používat.

DŮLEŽITÁ POZNÁMKA:

Celkově vytvořte dvě tabulky do dvou listů.

První tabulka bude obsahovat všechna původní data a pomocí filtru v ní budou odfiltrována data nechtěná. V této tabulce jsou v nových sloupcích uvedeny všechny změny a poznámky (např. poznámka o změně jednotek, poznámka o nalezené čistotě testované látky či poznámka o duplicitním údaji) pro pozdější kontrolu a případně změnu finální databáze.

Druhá tabulka se vytvoří do nového listu zkopírováním odfiltrované první tabulky. Tím pádem už obsahuje pouze zkopírovaná „chtěná data“, která budou použita pro tvorbu SSD.

2. Vytvořte druhou tabulku v Excelu (v novém listu) pro **KARBOFURAN (CAS 1563-66-2)**, ve které již budou pouze tři sloupce:

1. sloupec: druhový název organismu (latinsky)
2. sloupec: Taxonomická skupina, do které patří
3. sloupec: Geometrický průměr z hodnot EC50(+LD50, IC50 atd.) pro tento organismus

Pro pomoc při tvorbě vašich tabulek můžete použít to, co jste vytvořili na cvičení a přiložený vzorový Excel soubor: **Domaci ukol B2_vzor_alachlor.xlsx**

Pokud si s něčím nebudete úplně jistí, napište si poznámku do jednoho z nově vytvořených sloupců a zeptejte se na dalším cvičení.

BLOK 2

Termín: ST 15.4.2015: 13-15 - 2h v RCX-2

Obsah:

Diskuze nad zpracováním úkolu B2, dotazy k ECOTOX databázi atd.
ETX software a tvorba SSD modelu

Příprava na blok 2:

Vypracovat a odevzdat domácí **úkol B2 do neděle 5.4.** a výsledná data mít připravena na blok B2

Přečíst znovu- **STUDIJNÍ MATERIÁL 2: Návod na tvorbu SSD modelů;** (Str.15)

Úkoly navazující na blok 2:

Zpracování dat z US EPA Ecotox databáze a vytvoření SSD modelů pro vámi vylosovanou látku v rámci domácího úkolu B5 (Str. 37)

BLOK 3

Termín: **PO 30.3. - PÁ 3.4.2015:** hodiny, učebny a skupiny dle rozpisu v časovém harmonogramu

Obsah:

Vyhodnocování výsledků ekotoxikologických biotestů v MS Excel a GraphPad PRISM – na počítačích

Příprava zásobních roztoků a materiálu k laboratornímu cvičení

Diskuze řešení úkolu B3, dotazy, triky, tipy, exkurze po laboratořích

Provedení baterie akvatických biotestů =řasy, dafnie, bakterie (Microtox)

Zadání úkolu B4

Příprava na blok 3:

Podrobně a pečlivě pročíst **STUDIJNÍ MATERIÁL 3 - Návod k laboratorním úlohám (řasy, dafnie, Microtox)**; (Str.21)

Vypracovat a odevzdat **DOMÁCÍ ÚKOL B3 do ČT 28.3.** (zadání na str. 33) a výsledná data mít připravena na blok B3

Úkoly navazující na blok 3:

DOMÁCÍ ÚKOL B4 (zadání na str. 35) **do ČT 9.4.2015** na zuzana.tousova@seznam.cz

STUDIJNÍ MATERIÁL 3:

Zkouška inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*

Zpracováno podle normy OECD 201 (ISO 8692) a české technické normy TNV 757741.

Princip

Odpověď organismu (inhibice/stimulace růstu) po expozici dané koncentraci látky je porovnávána s průměrným růstem kontroly.

Test byl optimalizován pro provedení v 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách. Exponovaným organismem je zelená řasa *Raphidocelis subcapitata* (Syn. *Selenastrum subcapitata*, *Pseudokirchneriella subcapitata*). Vybrané koncentrace sledované látky jsou testovány vždy v 5 opakováních. V experimentu stanovujeme růst řas jako změnu optické density řasové suspenze na konci a na začátku experimentu. Optická densita (absorbance 680nm) koreluje s počtem buněk na mL a měříme ji pomocí spektrofotometru - je tedy dobrým a jednoduchým zástupným parametrem k rychlému stanovení růstu řas v testovém systému.

Přístroje a chemikálie

- řasová kultura o dostatečné hustotě buněk na mL - kultivovaná ve standardním médiu (50% ZBB médium)
- 96-jamkové mikrotitrační desky (250uL/jamka), automatické pipety, špičky k pipetám, nádoby pro vyředění odpovídajících koncentrací testované látky
- destilovaná voda, nesterilní 200% ZBB médium
- dichroman draselný – pozitivní kontrola

Podmínky testu

- doba expozice: 3 dny (72h)
- interval měření: založení testu 0h, po 24, 48, 72 hodinách expozice
- teplota 23°C
- osvětlení 2080 lux (použití klasické halogenové zářivky a zářivky Aqua Glo fialová, 40W)

Příprava experimentu a pracovní postup:

Pro založení pokusu je potřeba přichystat správně naředěné inokulum řas v 50% ZBB médiu, které napipetujeme po 125uL do každé testové jamky (tvoří tedy polovinu objemu testové jamky). Druhou polovinu objemu jamky (125 uL) pak tvoří ředění vzorku v 50% médiu, které následně přidáváme k řasovému inokulu dle pipetovacího schématu:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank médium	blank C5	blank C4	blank C3	blank C2	blank C max	blank médium	blank PC4	blank PC3	blank PC4	blank PC1	blank médium
B	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
C	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
D	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
E	blank médium	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	blank médium
F	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
G	blank médium	C5	C4	C3	C2	C1	NC	PC4	PC3	PC4	PC5	blank médium
H	blank médium	blank C5	blank C4	blank C3	blank C2	blank C max	blank médium	blank PC4	blank PC3	blank PC4	blank PC1	blank médium

NC = negativní kontrola
SC = rozpouštědlová kontrola (solvent control)
PC = pozitivní kontrola (dichroman draselný 1.25-2.5-5-10 mg/L)
C5 min = nejnižší koncentrace testované látky
C1 max = nejvyšší koncentrace testované látky

Příprava média

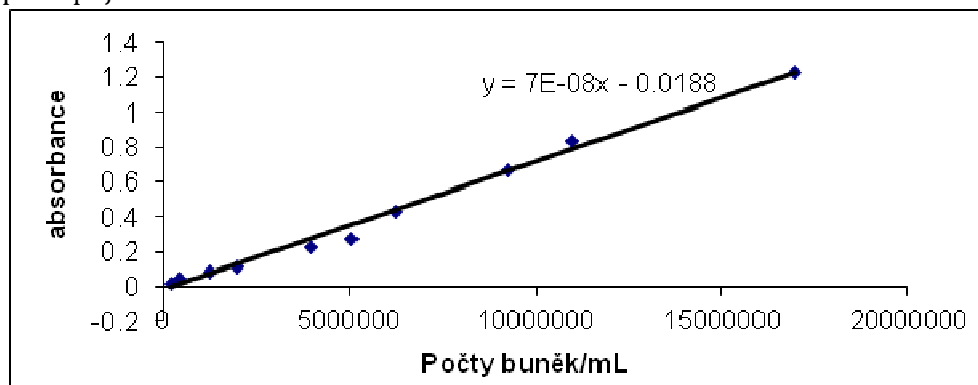
Řasy se kultivují v 50% ZBB médiu, jde o optimalizovanou směs živin a minerálů vhodnou pro kultivaci řas a sinic (přesné složení bude diskutováno na cvičení). Stejně médium se užívá i pro expozice řas v testu toxicity. K dispozici budete mít koncentrát, 200% ZBB médium, tento zásobní roztok se ředí na požadovanou koncentraci destilovanou vodou.

Příprava inokula řas – řasové suspenze

Řasové inokulum v exponenciální fázi růstu (=koncentrovaná řasová suspenze odebraná z laboratorní kultury) odebereme sterilně ze zásobní kultury v kultivační laboratoři. Potom řasové inokulum vyředíme kultivačním médiem (50% ZBB) na požadovanou hustotu buněk na 1 mL a odpovídající objem. Výchozí množství buněk/mL na začátku experimentu by mělo být cca **100 000**. Počty buněk na mL zjistíme pomocí měření na spektrofotometru (A680) a výpočtu s užitím rovnice kalibrační křivky (viz obr.1). Obvykle řasy do testu ředíme faktorem 4 (tedy 1:3).

Určení počtu buněk/mL v zakoncentrované řasové suspenzi – řasovém inokulu:

Měření optické density provedeme na čisté mikrodesece. Do 3 sousedících jamek napipetujeme 250 uL 50% ZBB média (blank) a do dalších 3 sousedících jamek napipetujeme **250uL** koncentrované řasové suspenze. Proměříme absorbanci (680nm) a naměřené údaje použijeme pro výpočet ředícího faktoru. Ředící faktor vypočteme pomocí jednoduché lineární kalibrační rovnice (závislost optické density na počtu buněk na mL). Při měření na spektrofotometru postupujte dle instrukcí cvičícího.



Obr.1: Kalibrační křivka pro závislost absorbance na počtu buněk v řasové suspenzi

Řasovou suspenzi naředíme v kádince 50% ZBB médiem na dvojnásobný počet buněk na mL než je výsledný požadovaný počet (tedy na 200 000 buněk/mL), protože suspenzi budeme následně v jamkách 2x ředit přidávaným vzorkem v médiu.

Takto naředěnou suspenzi řas rozpipetujeme na 96-jamkovou mikrotitrační desku dle pipetovacího schématu – 60 vnitřních jamek desky, okrajové jamky jsou určeny pro blanky.

Před rozpipetováním suspenzi řas důkladně promíchejte. Pozor – řasy mají tendenci sesedat, **míchání je opravdu důležité!**

Příprava koncentrační řady testované látky a pozitivní kontroly

Koncentrační řadu testované látky (vzorku) si připravíme postupným ředěním zásobního roztoku látky (vzorku) 50% ZBB médiem v plastový epinkách či skleněných vialkách.

Pro přípravu koncentrační řady testované látky je důležité si nejprve uvědomit:

1. Jaký celkový objem směsi řas+média+testované látky budeme potřebovat pro 5 opakování, jaký objem pro negativní kontrolu/ pozitivní kontrolu/ blanky? **Vždy je dobré uvažovat i nějakou rezervu!**
2. Jaký ředicí faktor (DF – dilution factor) je mezi jednotlivými koncentracemi testované látky?
3. Jaké negativní kontroly je třeba zahrnout do experimentu (je látka rozpuštěna ve vodě nebo v organ. rozpouštědle)?
4. Jaké blanky je třeba zahrnout do experimentu – pro odečtení absorbance média a vzorku?

Při úvahách nad objem přidávaného vzorku je nutné myslet na to, aby koncentrace média a případně rozpouštědla byla ve všech jamkách stejná. Obsah rozpouštědla by neměl přesáhnout **0.5% cílového objemu v testové jamce (v/v)**. V některých případech je tedy nutné koncentraci zásobního roztoku adekvátně upravit.

V každém kroku je nutné směs testované látky s 50%ZBB médiem důkladně promíchat – (vortex/pipeta/krouživý pohyb).

Jednotlivé koncentrační varianty rozpipetujeme na desku po **125 uL** na jamku

- 1 ředění vzorku ve vialce/epince- pro 7 jamek + rezerva = **1000 uL**.

Obdobně jako u testované látky postupujeme při přípravě 4-bodové koncentrační řady pozitivní kontroly – dichromanu draselného. Cílové koncentrace jsou **1.25-2.5-5-10 mg/L** (DF 2) a koncentrace zásobního roztoku je **2 g/L**. Dichroman draselný je rozpuštěný **ve vodě**.

Měření absorbance

Absorbanci měříme při vlnové délce 680 nm. **Před každým měřením je nutné jednotlivé jamky promíchat multikanálovou pipetou !!!**

Získaný soubor (ve formátu MS-Excel) uložte na pevný disk počítače do adresáře

"C:/biotesty_cviceni_2015 ve formátu datum_latka_casovy interval (např:

150331_carbofuran_0h; 150401_carbofuran_24h; atd.)

Expozice

Mikrodestičku přikryjeme víčkem a exponujeme v inkubační místnosti s řízeným světelným režimem.

- Doba expozice: 3 dny
- Interval měření: 0h, 24h, 48h, 72h
- Podmínky expozice: teplota 23°C, osvětlení 2080 lx (použití klasické halogenové zářivky a zářivky Aqua Glo fialová, 40W)

Vyhodnocení

Výsledkem testu toxicity na řasách jsou dva endpointy – **inhibice růstové rychlosti** a **inhibice výtěžku**. Vyhodnocení výsledků experimentu provádíme v programech MS Excel a GraphPad Prism.

V MS Excel provedeme první výpočty.

1. Od každé naměřené hodnoty vzorku/kontroly odečteme průměrnou absorbanci blanku (destil. voda v okrajových jamkách).
2. Pro každou koncentrační variantu/kontrolu vypočteme průměr, směrodatnou odchylku a koeficient variance
3. Vyloučíme případné odlehlé hodnoty (CV>10%)
4. Endpoint – **INHIBICE RŮSTOVÉ RYCHLOSTI (Growth rate inhibition):**

Z upravených hodnot vypočítáme růstovou rychlost dle vzorce:

$$\mu = \frac{\ln OD_{\text{konec}} - \ln OD_{\text{start}}}{t_{\text{konec}} - t_{\text{start}}}$$

kde:

μ	průměrná specifická růstová rychlost v čase 0-x (dny);
t_{start}	časový začátek expozice (0 den);
t_{konec}	časový interval měření (x-tý den);
OD_{start}	absorbance (po odečtení blanku) v čase 0 (dny);
OD_{konec}	absorbance (po odečtení blanku) v čase x (dny);

Hodnoty růstové rychlosti použijeme pro výpočet inhibice růstu dle vzorce:

$$\%I = \frac{\mu_K - \mu_V}{\mu_K} * 100$$

kde:

μ_K	- průměr specifické růstové rychlosti kontroly
μ_V	- průměr specifické růstové rychlosti jednotlivých variant koncentrací toxikantu
$\%I$	- procento inhibice růstu oproti negativní/rozpouštědlové kontrole v dané koncentrační variantě

Pro kontrolu validity testu je třeba spočítat růstovou rychlost v každém časovém intervalu (0-24; 24-48; 48-72) – růstová rychlost kontroly by se měla pohybovat v intervalu 0.4-1.

5. Endpoint – **INHIBICE VÝTĚZKU (Yield inhibition):**

Z upravených hodnot vypočítáme výtěžek biomasy dle vzorce:

$$Y = OD_{\text{konec}} - OD_{\text{start}}$$

kde:

OD_{start}	- absorbance (po odečtení blanku) v čase 0 (dny);
OD_{konec}	- absorbance (po odečtení blanku) v čase x (dny);

Dále vypočítáme inhibici výtěžku biomasy dle vzorce:

$$\%I = \frac{Y_K - Y_v}{Y_K} * 100$$

kde:

Y_k - výtěžek kontroly

Y_v - výtěžek jednotlivých variant koncentrací toxikantu

6. Výpočet účinných koncentrací:
Výsledné hodnoty inhibice růstové rychlosti a výtěžku biomasy vložte vždy k odpovídajícímu logaritmu koncentrace do softwaru GraphPad PRISM, a vypočtěte hodnoty **IC50**, **IC20**, **NOEC** a **LOEC** pro oba endpointy. Stejný výpočet proved'te pro pozitivní kontrolu – dichroman draselný. Při výpočtu postupujte dle instrukcí získaných na úvodní hodině (Dr. Jiří Novák).
7. V MS Excelu a GraphPadu sestrojte graf závislosti inhibice růstové rychlosti a výtěžku biomasy na koncentraci toxikantu a obdobný graf s pozitivní kontrolou – dichromanem draselným. V grafu zobrazte variabilitu vašich výsledků vyznačením směrodatné odchylky.

Ověření citlivosti

Zkouška se považuje za platnou, pokud se EC50 způsobena referenčním roztokem (dichroman draselný- pozitivní kontrola) pohybuje v rozmezí 0.8-1.2 mg/L.

Zkouška inhibice luminiscence emitované mořskými bakteriemi *Vibrio fischeri*

Zpracováno podle ISO 14735 (2005)

Jedná se o rychlý, jednoduchý a levný test akutní toxicity na prokaryotickém organismu, který slouží ke sledování toxických účinků nejen čistých chemických látek či jejich roztoků, ale i environmentálních směsí extrahovaných z různých vzorků. Tato metoda je méně vhodná pro silně zabarvené vzorky nebo vzorky obsahující nerozpuštěné látky nebo látky, které reagují s živným roztokem nebo podléhají změnám během zkoušky (například vysrážení, biochemickému nebo fotochemickému rozkladu), a tím mohou poskytovat nesprávné výsledky, popřípadě zhoršit reprodukovatelnost.

Princip

Testovacím organismem v testu je mořská bakterie *Vibrio fischeri*, která za optimálních podmínek intenzivně luminuje (světélkuje). Test je založen na zhášení bioluminiscence této bakterie, je-li ve vzorku přítomna biodostupná toxická látka, která může metabolickou aktivitu bakterií významně snížit, případně zastavit. To se ihned projeví poklesem intenzity luminiscence (bioluminiscence). Množství emitovaného světla se měří luminometrem před a po přidání testované látky (po 15 a 30 minutách expozice). Teplota v průběhu testu musí být konstantní ($t = 15^{\circ}\text{C}$).

Přístroje a chemikálie

- Cirkulační termostat s možností teploty na 15°C
- Chlazený luminometr,
- Automatické pipety 5 – 50 μl , 50 – 200 μl , 200 – 1000 μl , 1000 – 5000 μl , špičky,
- NaCl
- Modelový toxikant - dichroman draselný ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) – pozitivní kontrola
-

Podmínky testu

- teplota: 15°C
- délka expozice 15 a 30 min.

Příprava experimentu a pracovní postup

Příprava bakteriální suspenze *Vibrio fischeri* pro test:

Bakterie je nutné připravit ve dvou, na sebe navazujících krocích:

1. Ampulku s lyofilizovanou kulturou vyjmeme z mrazicího boxu a do ampulky napipetujeme **0.5 mL rekonstitučního roztoku** dodávaného společně s bakteriemi. Třepáním rozpustíme lyofilizované bakterie v roztoku a po rozpuštění bakterií je pomocí pipety provzdušníme. Takto připravenou ampulku necháme inkubovat na ledu v lednici min. 30 minut.
2. Po uplynutí 30 minut je možné rehydratované bakterie rozředit pro test. **100 μL rehydratované suspenze** napipetujeme do **4 mL roztoku 2% NaCl** ve zkumavce (je také možné použít výrobcem dodávaný rekonstituční roztok z plastové nádoby). Použití výrobcem dodávaného roztoku je žádoucí, je-li k dispozici, jelikož dosažené luminiscence jsou vyšší. Takto naředěné bakterie pak ponecháme inkubovat v suché lázni při teplotě 15°C po dobu minimálně 15, ale spíše 30 minut.

Příprava koncentrační řady testované látky a pozitivní kontroly

Připravíme si dvě 96-jamkové desky. Jednu průhlednou - v ní se bude připravovat ředící řada a jednu bílou - ta bude nakonec měřena.

Předem je nutné si rozmyslet rozložení vzorků na desce a podle toho začít s její přípravou. Níže popsaný postup je platný pro ředění vzorků pomocí dvojkové ředící řady. V případě potřeby jiného stupně ředění je třeba příslušně upravit pipetované objemy do jednotlivých jamek. V tomto případě pamatujeme na výsledný objem vzorku v jamce. Ředění probíhá přímo v desce postupným přepipetováním určitého objemu z jedné jamky do druhé.

Celý experiment se běžně provádí v duplikátu (je samozřejmě možné použít i jiný počet replikátů) – ve cvičeních budeme celý experiment provádět jen jednou, přičemž každou koncentraci budeme testovat v 5 opakováních (každá dvojice využije pouze polovinu desky).

Tab. 1: Možná podoba napipetované desky se vzorky:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	NC/SC	NC/SC	PC	PC	NC/SC	NC/SC						
b	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
c	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
d	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
e	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
f	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
g	C1	C2	C3	C4	C5	NC/SC						
h	NC/SC	NC/SC	PC	PC	NC/SC	NC/SC						

NC- negativní kontrola (2% roztok NaCl)

SC – rozpouštědlová (solvent) kontrola - (2% roztok NaCl) s přídavkem rozpouštědla

PC- pozitivní kontrola (standardně se používá roztok dichromanu draselného v koncentraci $EC_{50}=53 \text{ mg/l} = 18,7 \text{ mg/l Cr}^{VI+}$)

C 1- C5- koncentrace vzorků

Pozn. 1. Je nutné mít na desce alespoň 2 duplikáty negativní kontroly. Lepší však je mít dvě jamky na každém řádku a pro každý řádek s nimi počítat pro výpočet korekčního faktoru pro daný řádek (*na jedné desce jsou měřeny vzorky pro 2 dvojice, NC/SC budete mít dohromady*).

Na každém řádku může být koncentrační řada jednoho vzorku nebo může být vzorek naředěn do více řádků, je-li to potřeba (hodně toxický vzorek).

Nejvyšší koncentraci látky C1 si připravte ve vialce smísením zásobního roztoku vzorku a 2% roztoku NaCl. Poté rozpipetujte C1 na desku dle schématu (**300uL na jamku**) a další ředění připravte opět s použitím 2% roztoku NaCl přímo na ředící desce. Pro usnadnění práce je možné použít multikanálovou pipetu.

Nezapomeňte, že na desce musí zůstat jamky s negativní kontrolou, bez vzorku. A také na to, že je nutné při posledním ředění vzorku nevracet kapalinu z pipety zpět do jamek, ale vypustit ji jinam (do odpadu). Pokud by se napipetovaný objem v pipetě vrátil zpět do jamek, tak by v těchto jamkách byl dvojnásobný objem roztoku

Stejně jako u vzorku postupujeme u pozitivní kontroly ($K_2Cr_2O_7$, $c= 53 \text{ mg/l}$)

Připravenou desku dáme temperovat na 15°C po dobu 30 minut.

Pozn. 2. Příprava C1 může být složitější a je třeba uvažovat o charakteru zásobního roztoku vzorku/testované látky.

1. Roztok vzorku neobsahuje sůl (NaCl)- v tomto případě je nutné do vzorku přidat slaný roztok, aby výsledná koncentrace NaCl byla přibližně 2% (kvůli osmotické rovnováze-). K tomuto účelu se

používá prakticky nasycený roztok soli (32 %) - aby se vzorek co nejméně naředil. V tomto případě se do jamky napipetuje **280 µL vzorku** a přidá se **20µL koncentrovaného slaného roztoku**. Výsledný objem v jamce je tedy **300 µL**. Pamatujte, že tímto se vzorky naředí- nutno zohlednit ve výpočtech!

2. Testovaný vzorek byl přímo připraven za pomoci 2 % roztoku NaCl (týká se látek, které jsou k dispozici v sypkém nebo suchém stavu a před měřením se připravuje roztok). V tomto případě se do prvních jamek napipetuje přímo **300µLvzorku**. – *toto je varianta, kterou používáme ve cvičení*

Pozn. 3. Environmentální vzorky se zkoušejí co nejdříve po odběru či přípravě. Vzorek se důkladně protřepe a je-li to nutné, homogenizuje. Vzorek by měl být upraven na pH $7,4 \pm 0,3$.

Během 30 min temperování ředicí desky si připravíme druhou (bílou-měřicí) desku a do ní napipetujeme **30 µL suspenze bakterií** (byla naředěna a temperována dříve).

Nyní máme připraveny všechno potřebné a můžeme začít s měřením desky.

Expozice a měření luminiscence

Použijeme destičkový luminometr Biotech synergy TM umístěný v chladicí skříni v přístrojové laboratoři.



Přístroj se ovládá pomocí počítačového programu Gen 5

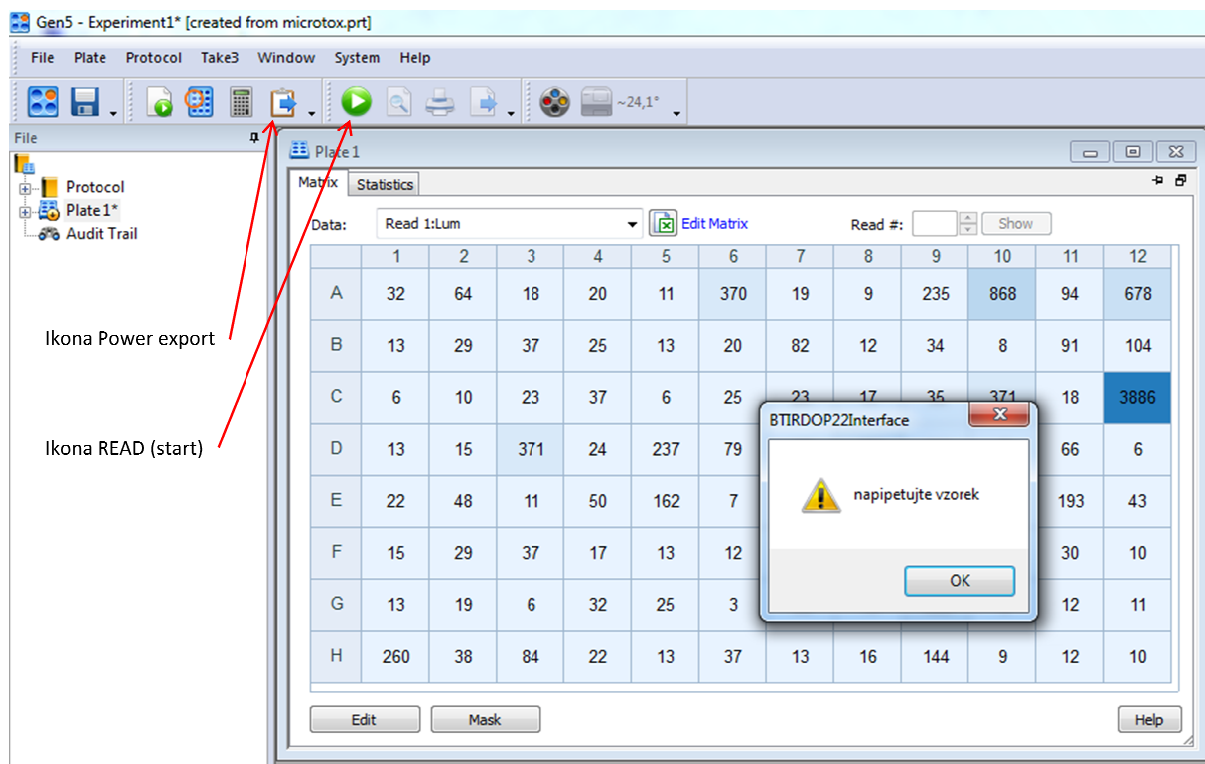
Otevřeme testový protokol mikrotox.prt (ve složce experiment) a umístíme desku na rámeček luminometru. Program spustíme klikem na tlačítko READ. Software nás vyzve k uložení měření. Po uložení a odsouhlasení kontrolních oken deska zajede do přístroje a změří se počáteční luminiscence bakterií. Až je změřena každá jamka, deska znovu vyjede z přístroje a na obrazovce se objeví okno „napipetujte vzorek“ (Obr. 2). Pomocí multikanálové pipety napipetujeme **120 µL vzorků z průhledné desky** do bílé desky k bakteriím. Dáváme přitom pozor, abychom vzorky nějak na desce neposunuli a tím jsme nezměnili výsledky. Pokud budeme při přepipetování vzorků postupovat od negativních kontrol a nejzředěnějších roztoků k nejvyšším koncentracím, není potřeba měnit špičky.

Po napipetování vzorků umístíme bílou desku zpět do přístroje a odklikneme tabulku. Měření automaticky pokračuje po dobu 30- ti minut.

Po třiceti minutách deska vyjede z přístroje a pomocí nástroje Power export (obr. 2) si necháme výsledné luminiscence vyexportovat do Excelu.

Získaná data poté vyhodnotíme, spočítáme výsledné inhibice a EC 50. Je vhodné z korekčních faktorů negativních kontrol udělat průměr a ten dosazovat do vzorce inhibice luminiscence (viz níže).

Pozn: Při výpočtech koncentrací a ředění **nezapomeňte, že se vzorky v průběhu přípravy experimentu ředí suspenzí bakterií** – v kroku nepipetování z průhledné ředicí do bílé měřicí desky.



Obr. 2: Výřez obrazovky softwaru Gen5 při měření luminometrem. Můžete vidět výše popsané ikony a okno vyzývající k napipetování vzorků z jedné desky do druhé.

Výpočty

Nejdříve vypočítáme koeficienty přirozeného vyhasínání bioluminiscence pro jednotlivé časy:

$$R_t = I_{Kt} / I_{K0}$$

Kde:

R_t je koeficient přirozeného vyhasínání v čase t

I_{Kt} je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase t

I_{K0} je intenzita bioluminiscence u kontroly v čase 0

Ke kvantitativnímu vyhodnocení se vypočítá procentuální úbytek světla (inhibice bioluminiscence):

$$\text{Inh}\% = (R_t \cdot I_0 - I_t) / (R_t \cdot I_0) \cdot 100$$

Kde:

R_t je koeficient přirozeného vyhasínání v čase t

I_0 je bioluminiscence v čase 0

I_t je naměřená bioluminiscence v čase t

Výpočet EC_{50} se provádí z křivky dávka-odpověď. K výpočtu doporučujeme použít program GraphPad Prism, s jehož obsluhou jste byli seznámeni v předchozích hodinách.

Ověření citlivosti

Zkouška se považuje za platnou, pokud jsou splněny následující podmínky:

- Koeficient přirozeného vyhasínání R_t se pohybuje v rozmezí 0.6-1.8

- Referenční roztoky (všechny tři pro zásobní kulturu nebo pouze dichroman draselný pro každý test) způsobují 20-80% inhibici po 30 minutách pro následující koncentrace standardních látek:

3.4mg/L 3,5-Dichlorphenol

2.2 mg/L Zn (II) 9.67 mg/L ZnSO₄·7H₂O

18.7 mg/L Cr (VI) = 52.9 mg/L K₂Cr₂O₇

Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Zkouška akutní toxicity

Zpracováno podle ČSN ISO 6341

Metoda stanovení akutní toxicity chemických látek, průmyslových odpadních vod a povrchových nebo podzemních vod pro *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*).

Princip

Zkouška je založena na určení koncentrace látky, která za 24 (48) hodin imobilizuje 50% jedinců *Daphnia magna* vystavených podmínkám testu.

Přístroje a chemikálie

- automatická pipeta + špičky
- plastová kapátka
- testovací destička (30 jamek, objem jamky 10 mL)
- kádinky
- odměrný válec
- chemikálie na přípravu média - chlorid draselný KCl, hydrogenuhličitan sodný NaHCO₃, chlorid vápenatý CaCl₂, síran hořečnatý MgSO₄
- pozitivní kontrola - dichroman draselný K₂Cr₂O₇

Podmínky testu

- teplota: 20 ± 2 °C
- délka expozice 24hod (48 hod.)
- fotoperioda 16h světla/8 h tmy

Příprava experimentu a pracovní postup

Příprava média

Nejprve je třeba připravit dostatečné množství média pro všechny kroky postupu experimentu.

Zásobní roztoky:

8,88g CaCl₂ se rozpustí v 1L destilované vody

4,93g MgSO₄ se rozpustí v 1L destilované vody

2,59g NaHCO₃ se rozpustí v 1L destilované vody

0,23g KCl se rozpustí v 1L destilované vody

- na 1L média se dávkuje 25 mL z každého zásobního roztoku, do odměrné baňky 1L se nalije část destilované vody, přidají se zásobní roztoky a doplní se destilovaná voda
- aeraci se roztok nasytí kyslíkem (koncentrace kyslíku by neměla klesnout pod 7 mg/L) a zkontroluje se pH (7,8±0,2)
(*médium budete mít připravené*)

Příprava organismů na test

Do experimentu se nasazují jednodenní juvenilové, proto je potřeba 1 den před založením experimentu vyčlenit do speciální nádoby – kádinky (0.5L) s médiem několik gravidních samic. Toto přenesení samic do oddělené nádoby je impulsem k rození mláďat.

Příprava koncentrační řady testované látky

Ředící řadu testované látky (5 konc. bodů) připravíme v dostatečném objemu ve skleněných kádinkách. Látku postupně ředíme v médiu a přidáváme-li látku (vzorek) v jiném rozpouštědle než ve vodě, tak je nutné dbát na to, aby ve všech testových variantách byla stejná koncentrace rozpouštědla, maximálně však **0.5% v/v**. Z kádinek potom napipetujeme po **10mL** do každé testové jamky na plastové testové desce dle doporučeného schématu. Na každou koncentraci připadá 5 opakování, přičemž první jamka v řadě slouží jako jamka na oplach.

Jako pozitivní kontrola se používá standardní toxikant dichroman draselný (3.2 – 1.6 – 0.8 – 0.4 – 0.2 mg/L).

(... desku s pozitivní kontrolou založí cvičící)

Nasazení organismů do testu

Do jamky na oplach přeneseme kapátkem 20 jedinců z nádoby s juvenily a poté přenášíme po 5 jedincích do jednotlivých testových jamek. Tímto zabráníme nežádoucímu naředění testované látky při manipulaci s kapátkem.

Schéma desky:

		A	B	C	D
NC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC	NC/SC
1	C min	C min	C min	C min	C min
2					
3					
4					
5	C max	C max	C max	C max	C max

Jamka na oplach Testové jamky

Expozice a vyhodnocení imobilizace

Desku s dafniemi necháme exponovat v kultivační laboratoři při teplotě 20 ± 2 °C a světelném režimu 16h světlo/8h tma.

Na konci zkušební doby 24h (48h) se spočítají mobilní jedinci v každé nádobě. Jedinci, kteří nebudou schopni se rozplavat za 15 s po mírném zamíchání roztoku, se považují za imobilizované, i kdyby dosud pohybovali tykadly.

Výsledky včetně jakýchkoli anomálií v chování dafnií si zaznamenáme.

Vyhodnocení výsledků a výpočty

Výsledky zaznamenáme do Excelu a jednoduchým výpočtem určíme % imobilizace v jednotlivých opakování. Pomocí softwaru Graphpad Prism stanovíme účinné koncentrace EC20, EC50, NOEC a LOEC.

$$\%I = \frac{x}{5} * 100$$

Kde:

x je počet imobilizovaných jedinců

Platnost zkoušky

Zkouška se považuje za platnou, pokud jsou splněny následující podmínky:

- mortalita v kontrole na konci zkoušky je $\leq 10\%$

24h- EC₅₀ pro dichroman draselný je v rozsahu 0.6-1.7 mg/L

DOMÁCÍ ÚKOL B3

Chemické výpočty, ředící řady, plánování experimentu

Cíl úkolu 1: Cílem úkolu je samostatně naplánovat experimenty dle návodů k jednotlivým laboratorním úlohám (str. 21, 26 a 31) a s užitím informací o vámi vylosované látce v souboru Biotesty_cv_latky.xlsx.

To znamená vypočítat potřebné navážky testované látky (znáte molární koncentraci zásobního roztoku), potřebné objemy jednotlivých koncentrací testované látky, media, naplánovat použití rozpouštědla a postup ředění. Úkol má posílit schopnost studentů samostatně plánovat experiment a správně provést všechny přípravné kroky včetně základních chemických výpočtů.

Vypracovat do: Všechny vypracované výpočty buď v **MS Excel (doporučeno)** nebo MS Word **do ČT 26.3.2015** na zuzana.tousova@seznam.cz; pokud preferujete práci s tužkou a papírem, pošlete mi prosím nascanované obrázky vašich výpočtů a nákresů nebo přineste papíry osobně do kanceláře 332 (v případě ruční práce piště prosím čitelně a přehledně, díky)

Skupiny: úkol se odevzdává za dvojici

Přesné zadání úkolu:

1. Pečlivě si prostudujte STUDIJNÍ MATERIÁL 3 s návody k laboratorním úlohám a přiloženou tabulku s informacemi o vaší látce (Biotesty_cv_latky.xlsx)
2. Všechny biotesty budete provádět v 5-ti bodových koncentračních řadách s ředícím faktorem (DF) 2 nebo 5. Koncentrační rozsah určený k testování včetně všech 5 koncentračních bodů ke každé látce a organismu je uveden v tabulce v řádcích 21, 22 a 23.
3. Vaším úkolem je dle manuálu a tabulky k jednotlivým laboratorním úlohám vypočítat následující:
 - Ze známé molární koncentrace zásobního roztoku vaší látky (řádek 19, zeleně v tabulce):

Vypočítejte:

- A. Potřebnou navážku látky na 1 mL tohoto zásobního roztoku**
- B. Jaký celkový objem zásobního roztoku o dané koncentraci budete potřebovat na pokrytí potřeb všech experimentů s předepsanými koncentračními rozsahy? Počítejte s nějakou rezervou**

Odpovězte:

- C. Jaké zvolíte rozpouštědlo a proč?**

- Příprava médií
 - D. Vypočítejte celkové objemy médií potřebné pro jednotlivé testy**

- Příprava ředicích řad
 - E. Naplánujte si, jak budete látku ředit v jednotlivých testech - vypočítejte **přípravu případných meziředění zásobního roztoku, objem přídávku zásobního roztoku, objem přenášený z vyšší koncentrace do nižší při postupném ředění v médiu, přídavek rozpouštědla** (pokud je nutný)

Vždy je potřeba připravit o něco **VĚTŠÍ OBJEM PRO REZERVU!!!**

- Kontroly
 - F. Definujte, jaké **kontrolní varianty** jsou pro jednotlivé testy potřeba, vypočítejte přídavek rozpouštědla do rozpouštědlové kontroly (pokud je nutný)
 - G. Definujte, jaké **blanky (slepé varianty)** jsou v jednotlivých testech potřeba (pokud jsou nutné)

Vytvořte vždy přehledný plán experimentu pro každý biotest - řasy, dafnie a bakterie = celkem 3 (ideálně každý na 1 listu v excelu). Každý tento plán by měl obsahovat body D-E-F-G.

Body A,B,C týkající se přípravy zásobního roztoku by měly být shodné pro všechny 3 biotesty – stačí uvést pouze jednou. Uveďte cokoli dalšího důležitého vás napadne – správných možností je opravdu mnoho.

Při vašich úvahách se vždy snažte experimenty plánovat tak, abyste co nejméně plýtvali materiálem a chemikáliemi a vytvářeli co nejméně odpadu. Je důležité uvažovat:

- jaký **minimální objem jsme schopni napipetovat = 2 uL**
- jaké **minimální množství jsme schopni navázat = 5 mg**
- kolik zásobního roztoku budeme celkem potřebovat
- jaký maximální obsah rozpouštědla můžeme vnést do experimentálního systému, aby nedocházelo k významným negativním účinkům = **max 0.5% (v/v)**
- nezapomeňte zvážit **rozpustnost látky ve vodě** – v případě špatné rozpustnosti ve vodě, použijte jako rozpouštědlo **methanol** (o adekvátní čistotě)

některé testy mají složitý postup a dochází k sérii naředění vzorku – pro výpočet správného postupu ředění je dobré v těchto případech postupovat pozpátku

DOMÁCÍ ÚKOL B4

Vyhodnocení výsledků laboratorního testování

Cíl úkolu B4: Cílem úkolu je správně vyhodnotit výsledky 3 biotestů provedených na cvičení – inhibice růstu řas, imobilizace dafnií, inhibice luminiscence bakterií *Vibrio fischeri* - MICROTOX. Úkol 3 slouží jako nezbytná příprava k vypracování protokolu o laboratorním testování látky.

Vypracovat do: Vaše vyhodnocení v MS Excelu a Graphpadu pošlete **do čtvrtka 9.4.2014** 23:59 na zuzana.tousova@seznam.cz

Skupiny: práce ve dvojici → úkol odevzdává každá dvojice pro svou látku

Přesné zadání úkolu:

1. Pečlivě si prostudujte STUDIJNÍ MATERIÁL 3 – návody k laboratorním úlohám a postupy vyhodnocení výsledků jednotlivých biotestů
2. Vytvořte si **soubor v Excelu**, kde **každý biotest bude mít svůj vlastní list** a na tomto listu proved'te všechny úpravy a výpočty k danému biotestu.
3. Každý tento list by měl být **přehledný** a obsahovat tyto informace:

Hlavička – datum založení, datum ukončení experimentu, název a CAS číslo látky, testované koncentrace, rozpouštědlo, co je negativní, pozitivní (rozpouštědlová) kontrola

Primární (surová) data – zcela původní, naměřená, nijak nezměněná data

Upravená data + výpočty = všechny další operace s daty – výpočty průměrů, směrodatných odchylek, růstových rychlostí, % inhibice apod. Pokud nějakou hodnotu vylučujete jako odlehlou – prosím vyznačte to ve vašich datech.

Grafy – závislost odpovědi (sledovaného parametru) na koncentraci testované látky včetně: popisků os = hodnoty a kategorie (NC, SC, PC, koncentrace látky), chybových úseček značících směrodatnou odchylku

Poznámky – pokud se vám přihodila nějaká chyba, pozorovali jste něco zvláštního nebo výsledky vycházejí divně, napište to do kolonky poznámky v Excelu (uved'te prosím i vaše domněnky, proč).

POZOR: Při postupu vašich výpočtů a úprav **zachovejte hodnoty pro všechna opakování.**

NEredukujte si na začátku vaše naměřené hodnoty pouze na průměr z opakování, se kterým dál počítáte. V dalším kroku je potřeba do Graphpadu zadat konečné výsledky pro všechna opakování k logaritmu každé koncentrace.

Vytvořte si **soubor v Graphpadu** a v něm tabulku s výslednými daty pro každý biotest. Každou tabulku pak analyzujte tak, abyste získali hodnoty IC50, IC20, LOEC a NOEC. Postupujte dle návodu a instrukcí Dr. Jiřího Nováka.

BLOK 4

Termín: **PO 13.4.2015: 14-16** max. 2 hodiny, RCX-2

Obsah:

Diskuze řešení úkolu B4, dotazy, náměty na zlepšení pro zpracování protokolů
Zadání úkolu B5

Příprava na blok 4:

Podrobně a pečlivě pročíst **STUDIJNÍ MATERIÁL 3 - Návody k laboratorním úlohám (řasy, dafnie, Microtox)**; (Str.21)

Vypracovat a odevzdat **DOMÁCÍ ÚKOL B4 do ČT 9.4.** (zadání na str. 35), výsledná data mít připravena na blok B4

Úkoly navazující na blok 4:

DOMÁCÍ ÚKOL B5 (zadání na str.37) **do ČT 30.4.2015** na zuzana.tousova@seznam.cz

DOMÁCÍ ÚKOL B5

Zpracování souhrnného posudku o toxicitě látky

Cíl úkolu B5: Cílem úkolu je vypracovat souhrnný posudek o toxicitě vylosované látky, tzn. shrnout a zpracovat všechna doposud získaná data, využít další informační zdroje a vše smysluplně interpretovat v jednom souhrnném dokumentu. Na základě vašeho souhrnného posudku si připravte prezentaci na 10 minut o vámi vylosované látce. **Prezentace** vašeho projektu proběhne **v pondělí 11.5.2015: 15-16:30**

Vypracovat do: Váš souhrnně zpracovaný dokument – posudek o toxicitě vylosované látky v MS Word zasílejte na zuzana.tousova@seznam.cz **do čtvrtka 30.4.2015**

Skupiny: práce ve dvojici → úkol odevzdává každá dvojice pro svou látku

Přesné zadání úkolu:

Vytvořte souhrnný dokument o toxicitě vámi vylosované látky, který bude obsahovat tyto dílčí části:

1. všeobecné informace o vaší látce - rešerše
2. výsledky laboratorního testování
3. SSD model
4. celkové shrnutí a interpretace výsledků, srovnání lab. výsledků a SSD modelů

Detailní informace ke zpracování jednotlivých částí:

1. Rešerše informací o látce

Využijte internet k dohledání základních informací o vaší látce. K čemu se používá, jaký je její současný legislativní status, v jakých koncentracích se může vyskytovat v životním prostředí, jaké jsou případné toxikologické účinky látky pro člověka a jiné organismy i nejrůznější zajímavosti.

Tato část slouží především pro váš vlastní přehled a závěrečnou prezentaci. Informace, které dohledáte, vám také pomohou při interpretaci vašich vlastních výsledků. Budete-li uvádět jakékoli dohledané informace o látce ve vašem závěrečném posudku, nezapomeňte zdroje řádně citovat.

Tato část by měla být v rozsahu ½-1 stránka A4 (není to zásadní část vaší práce, nad tímto nemusíte trávit příliš mnoho času).

2. Výsledky laboratorního testování

Ve dvojici jste provedli laboratorní testování vaší látky na 3 modelových organismech – na bakterii *Vibrio fischeri*, zelené řase *Raphidocelis subcapitata* a hrotnatce *Daphnia magna* (BLOK 3) a vyhodnotili výsledky (DOMÁCÍ ÚKOL B4). Nyní zpracujete **souhrnný protokol o laboratorním testování**, který by měl ke každému biotestu obsahovat tyto náležitosti:

Hlavička	Datum založení, datum ukončení, jména studentů – pro každý experiment zvlášť
Princip úlohy	Krátký stručný popis principu metody na základě lab. manuálu
Postup	Krátký stručný popis postupu
Výsledky	Tabulka hodnot (tabulka je podkladem grafu) – pro každý endpoint (součástí tabulky by měl být průměr, směrodatná odchylka, CV% pro každou koncentraci a kontrolu) Graf v Excelu – pro každý endpoint – spojnicový se značkami, na ose x –

	<p>koncentrace jako kategorie, na ose y odpověď (%I) + SD – pěkný, přehledný, smysluplný</p> <p>Graf v Graphpadu pro každý endpoint – na ose x log koncentrace na ose y odpověď (%I) + SD, pro zobrazení proložení vašich výsledků sigmoidní křivkou dávka-odpověď</p> <p>Výsledné hodnoty IC (EC,LC) 50 a 20; NOEC, LOEC – pro každý endpoint (pokud lze spočítat, pokud nelze krátce popsat proč)</p>
Diskuze a závěry	Stručný slovní popis = interpretace výsledků. Důležité je uvést všechny okolnosti, zajímavosti a pozorování, které mohly nějakým způsobem ovlivnit vaše výsledky.

3. Sestavení modelu SSD pro vaši látku

Pokud stále nerozumíte teorii SSD, pak si přečtete znovu přečtete STUDIJNÍ MATERIÁL 1 a 2 (str. 7 a 15)

A. Tvorba databáze pro SSD model

Postup je vlastně tentýž, jaký byl v DOMÁCÍM ÚKOLU 1 pro karbofuran. Místo karbofuranu děláte databázi pro vaši vylosovanou látku. Postup níže uvedený je pro zopakování, ale je navíc doplněný o nějaké věci, ve kterých jste nejčastěji chybovali, takže bude dobré řídit se jím řídit.

1. Vytvořte první tabulku v Excelu, kde budou všechna akvatická data získaná z databáze US-EPA ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) a to pro vaši vylosovanou látku. Chceme pouze hodnoty EC50/IC50/LD50/ED50/LC50/ID50 (nevádí, když u nich bude hvězdička). Významy různých zkratk kontrolujte zde v **codelistu**: <http://cfpub.epa.gov/ecotox/blackbox/help/codelist.pdf>.
2. K tabulce si přidejte 4 nové sloupce: "změna jednotek", "čistota", "duplikáty", "poznámky". **Přidejte si je předtím, než použijete filtr!** Jinak se vám tyto sloupce do filtru nezahrnou a to bude později zdrojem chyb!
3. V této první tabulce pomocí filtru ponechte vybrané pouze:
 - a) akutní testy toxicity ("Exposure duration" 1 až 7 dní)
 - b) efekty, které mají přímý vliv na změnu abundance a složení společenství organismů jako "Effect": MORT, POP, GRO, ITX (vždy je nutné zkontrolovat ještě "Effect Measurement", jestli nejde o nějaký nechtěný efekt). Efekty REP a PHY musíme **VŽDY** posoudit podle "Effect Measurement". Je zde třeba trochu přemýšlet a používat **codelist**!
 - c) Typ expozice environmentálně relevantní ("Exposure Type" tedy např. E, P, R, S, atd. ! **ne** např. I, GV, ID, atd). Pokud zde narazíte na „NR“ nebo „NC“ údaj (tzn. že typ expozice není známý), pak jsou dvě možnosti. Pokud se jedná o rostlinu nebo bezobratlého, pak takový záznam bereme jako použitelný pro tvorbu SSD modelu a do databáze patří. Pokud se jedná o obratlovce, je potřeba najít článek, že kterého byl údaj převzatý a typ expozice zkontrolovat (a podle toho údaj buď vyřadit nebo ponechat).
 - d) Čistota testované látky $\geq 90\%$ ("Conc 1 Type (ug/L)" tedy všechna A plus taková F (či „NR“ či „NC“), u kterých po kontrole na <http://cfpub.epa.gov/ecotox/> zjistíte

čistotu alespoň 90 %). Pozor na data získaná testováním přípravků jako (v komentáři v online databázi je uveden nějaký název přípravku) - tato jsou nevhodná! Co znamenají zkratky v komentářích najdete v **Codelistu** (např. zkratky C, CO, FO, PU, TC, ...) - zkratka může znamenat, že látka je vhodná i nevhodná. Např. TC znamená technická kvalita a tento údaj se použít může, stejně jako CO či PU. Naopak např. C či FO je nevhodné. Názvy přípravků si můžete vygooglit – abyste věděli, o co se jedná. Čistotu dat, kterou jste kontrolovali, si poznamenejte do sloupce "čistota". Pokud jste čistotu nedohledali ani v online databázi a máte málo dat pro tvorbu SSD modelu (tj. méně než 15 druhů), tak vyhledejte původní článek a čistotu dohledejte v něm (podle selského rozumu zvažte, jestli hodnotu použít nebo ne).

- e) "Conc 1 (ug/L)" taková, aby to byly jasné hodnoty ("**Conc 1 Op (ug/L)**" **nesmí být "<" či ">"**). Pokud je "Conc 1 (ug/L)" uvedená jako NR, potom jí vypočítáme jako průměr minimální a maximální koncentrace ("Conc Min 1 (ug/L)" a "Conc Max 1 (ug/L)").
 - f) Všechny jednotky ("Conc Units (ug/L)") převed'te správně na jednotky ug/l !!! Do speciálního sloupce "změna jednotek" si poznačte, že jste jednotky převedli (včetně původního nepřevedeného čísla).
 - g) Hodnoty ve vzniklé databázi zkontrolujte a do sloupce "duplikáty" označte duplicitní hodnoty (tzn. hodnoty, které jsou úplně stejné pro stejný druh a pochází od stejného autora) a do sloupce "poznámky" podezřelé hodnoty (podezřele vysoké nebo nízké). Tyto hodnoty se také nebudou pro SSD model používat.
4. Vytvořte druhou tabulku (do nového listu), ve které budou zkopírovaná již data vhodná pro SSD model
 5. Vytvořte třetí tabulku (opět v dalším listu), ve které již budou pouze tři sloupce:
 1. sloupec: Druhový název organismu (latinsky)
 2. sloupec: Taxonomická skupina, do které patří
 3. sloupec: Geometrický průměr z hodnot EC50 (LD50, IC50 atd.) pro tento organismus (použijte excelovskou funkci "geomean" – **nezapomeňte však konečné hodnoty v tabulce uložit jako čísla, ne jako funkci**, jinak to později bude zlobit a nebude to fungovat).

B. Tvorba SSD modelu

*Postup je stejný, jako jste si vyzkoušeli na cvičení. Jako výstup od vás požadujeme 4 modely SSD (**model pro všechny druhy, model pro primární producenty, model pro bezobratlé a model pro obratlovce**) včetně obrázků grafů, výsledků z testů normality, hodnot průměru a směrodatné odchylky a hodnot HC5. To vše uložte např. ve Wordu (můžete používat printscreen). Ke každému modelu také napište krátký komentář – jestli je rozložení dat normální (jednak podle testů normality a jednak podle pohledu na grafy) a pokud ne, tak možný důvod, jestli jsou zde nějaké zřetelně nejcitlivější taxonomické skupiny a pokud ano, tak jaké a proč (pokud ne, tak také možný důvod) a jestli je model založen na dostatečném množství dat.*

Pokud pro některý z modelů nebudete mít žádná data nebo tak málo, že software ETX vám jej odmítne vytvořit, napište pouze komentář bez modelu.

1. Stáhněte si ETX 2.0 z http://www.rivm.nl/rvs/Risicobeoordeling/Modellen_voor_risicobeoordeling/ETX_2_0
2. Otevřete si ETX 2.0
3. Otevřete si vaši vytvořenou databázi v excelu (budete používat třetí – finální tabulku).
4. Zkopírujte do "Input toxicity data" (v ETX softwaru) vaše hodnoty a vytvořte základní **model pro všechny druhy**. Je výhodné si jednotlivé hodnoty do sloupce „label“ označit

podle taxonů (např. „PP“ pro primární producenty, „B“ pro bezobratlé a „O“ pro obratlovce) a v *Tools* → *Labels* nastavit barevné odlišení taxonů v grafu. Výstupy modelu si uložte (graf, výsledky testů normality, hodnoty průměru, směrodatné odchyly a HC5) do wordu a okomentujte.

5. Vytvořte si další tři SSD modely pro:
 - a. **Řasy a rostliny (tj. primární producenti)**
 - b. **Bezobratlé**
 - c. **Obratlovce**
6. Opět si výstupy modelů uložte (graf, výsledky testů normality, hodnoty průměru, směrodatné odchyly a HC5) do wordu a okomentujte.
 - a. Porovnejte tyto různé SSD modely:
 - b. Jaká taxonomická skupina je nejcitlivější? Pokud jsou všechny citlivé podobně, tak proč?
 - c. Je ve všech taxonomických skupinách dostatek hodnot pro tvorbu SSD modelu?
 - d. Jsou data ve skupinách normálně rozložena (splnila testy normality)? A proč?
 - e. Jsou testy normality ve skupinách lepší než testy normality pro celý soubor? Proč?

4. Srovnání dat získaných z laboratorních cvičení s vašimi SSD modely; souhrnná interpretace

Srovnajte vaše hodnoty získané z laboratorních testů s modely SSD, které jste vytvořili: Jsou vaše naměřené EC50 hodnoty srovnatelné s SSD modely? (Např. Je hodnota EC50 pro řasy podobná hodnotám pro primární producenty v SSD?) Pokud ne (např. o hodně vyšší nebo nižší), tak čím to může být způsobeno? Věříte víc vašim výsledkům nebo výsledkům z databáze a SSD modelu? A proč? Zkuste se trochu rozepsat o možných nejistotách, jak vašich laboratorních testů, tak SSD modelů.

Vyšel vám v laboratorních testech jako nejvíce citlivý (nejmenší hodnota EC50) organismus, který má být nejvíce citlivý (např. primární producent pro herbicid a bezobratlý pro insekticid)? Pokud ne, tak zkuste napsat, proč.

V jednom závěrečném odstavci popište celkové shrnutí všech vašich poznatků o toxicitě látky včetně vašeho názoru o rizicích, která vaše látka může představovat pro vodní ekosystémy. Jistě nemáte úplně všechny informace, ale na cvičeních si určitě můžeme dovolit toto zanedbat, proto se pokuste uvést nějaké vaše vlastní stanovisko k vaší látce – ohledně užití, rizik pro vodní ekosystémy, legislativních opatření, dostupnosti dat, potřeby dalšího výzkumu atd. Cílem je, abyste si vyzkoušeli interpretaci vašich vlastních poznatků a informací z databází či literatury.

BLOK 5

Termín: **PO 11.5.2015: 16-17:30**, 1.5 hod

Obsah:

Prezentace celosemestrálních projektů - posudků toxicity vylosovaných látek na základě integrace laboratorních výsledků a dat z SSD modelů

Diskuze

Příprava na blok 5:

Odevzdaný, opravený a schválený **DOMÁCÍ ÚKOL B5** - termín odevzdání **pondělí 11.5.2015: 15-16:30**

Zpracování úkolu B5 je možné po odevzdání **individuálně konzultovat v týdnu 4.5-7.5.2015 vždy 8-16:30**, po předchozí domluvě (zuzana.tousova@seznam.cz, kanceář 332)

Připravte si **prezentaci o vaší vylosované látce na 10 minut** - po dvojicích

Úkoly navazující na blok 5:

Žádné

BLOK 6

Termín: **ST 25.3.2015: 11-13, 2 hod.**

Obsah:

Založení kontaktního půdního biotestu s chvostoskoky

Příprava na blok 6:

Přečtete si **STUDIJNÍ MATERIÁL 4 - Návod k provedení Zkoušky inhibice reprodukce s chvostoskokem *Folsomia candida*** (Str. 43)

Vypracovat **DOMÁCÍ ÚKOL B6 do pondělí 23.3.2015** – zadání na str. 45

Úkoly navazující na blok 6:

Žádné

STUDIJNÍ MATERIÁL 4

Zkouška inhibice reprodukce s chvostoskokem *Folsomia candida*

Zpracováno podle normy ISO 11267 (1999)

Cílem úlohy je naučit se postup půdního biotestu, který hodnotí vliv kontaminace půd na přežívání a reprodukci chvostoskoka *Folsomia candida*. Tento biotest lze použít pro hodnocení ekotoxicity chemických látek (pesticidy, hnojiva), reálně kontaminovaných půd, vytěžených sedimentů a hlušiny, kalů z čistíren odpadních vod, odpadů, sutí a drtí a dalších pevných matric.

Princip testu

Synchronizovaná kultura chvostoskoků *F. candida* je exponována po dobu 28 dnů testované látky (kadmium) v umělé půdě. Na konci testu se hodnotí mortalita dospělých jedinců a reprodukce.

Přístroje a chemikálie

- synchronní kultura chvostoskoků
- umělá půda s pH 6 ± 0.5 ovlhčená na 50% WHC ve variantě bez kadmia - kontrola a ve variantě s 800 mg/kg kadmia)
- skleničky na testy (cca 150 mL), folie, gumičky
- sušené kvasnice, exhaustor, štěteček, miska s mřížkou na vyhodnocování testu
- inkoust
- váhy s přesností na 0.1 g
- inkubační místnost nebo termostat
- běžné laboratorní sklo a pomůcky – kádinky, filtrační papír, papírové ubrusky, lžičky, pasteurky, fixy, nůžky, stříčky s vodou, pryžové rukavice, laboratorní pláště

Příprava experimentu

Založení chovu

Kultura chvostoskoků *F. candida* se chová v plastových krabičkách nebo na Petriho miskách na směsi aktivního uhlí a sádry. Sádra a aktivní uhlí se smíchá v poměru cca 9 : 1. Do misky se nalije trochu vody a přidá mix aktivního uhlí a sádry tak, aby se vytvořila na dně souvislá vrstva. Připravené misky se nechají několik hodin zaschnout. Do substrátu se vytvoří ostrým předmětem několik rýh (pro kladení vajíček). Doprostřed misky se pak přidá špetka sušených kvasnic (droždí) a ovlhčí destilovanou vodou. Ze starších chovů se přidá na misku pomocí exhaustoru cca 40 středně velkých chvostoskoků. Miska se dobře uzavře a popíše. Chov se uchovává při 20 ± 2 °C. Chov je nutné kvůli pevně uzavřeným nádobám větrat jednou týdně, kdy se také kontroluje vlhkost substrátu a přidává špetka kvasnic. Optimální vlhkost se pozná tak, že černý substrát je lehce matný ne lesklý a po pokapání vodou se tato pomalu vsakuje.

Synchronizace chovů

Do testů se používají 10 - 12 dní staří juvenilní chvostoskoci. Na nový substrát (sádra s aktivním uhlím v poměru 9:1) přemístíme pomocí dechového exhaustoru větší jedince (= založení synchronizace). Přemístění chvostoskoků na nový substrát obvykle spouští ovipozici. Po 2 dnech dospělé jedince odstraníme a v kultivační nádobě zůstávají jen vajíčka (zkontrolujeme pod binokulárem). Počkáme na vylíhnutí vajíček a poté, co se objeví první juvenilové, odpočítáme 10 – 12 dní.

Příprava umělé půdy

Umělá půda dle norem OECD a ISO má složení:

- 10% vysušená rašelina přesátá a homogenizovaná přes 2 mm síto
- 20% kaolinový jíl s obsahem kaolinitu minimálně 30%
- 70% křemenný písek s minimálně 50% zrn 0.05 – 0.2 mm
- CaCO_3 se přidává tak, aby výsledné pH (KCl) bylo 6 ± 0.5

Maximální vodní kapilární kapacita půdy

Maximální vodní kapilární kapacita půdy (WHC_{max} dle angl. Maximum Water Holding Capacity) je stav, kdy je půda schopna v přirozeném uložení udržet v kapilárních pórech největší množství vody. Vyjadřuje se v jednotkách objemu vody na gram suché zeminy. Procentuální vyjádření WHC znamená kolik procent nasycení půdy vodou - maximální WHC_{max} (100% WHC) - je požadováno. Vlhkost umělé půdy do testu s chvostoskoky je ideální cca 50% WHC.

Postup testu

Založení testu:

- Do skleněných nádobek na test navažte po 30 g půdy (2 opakování od každé koncentrace i kontroly).
- Na povrch půdy dejte špetku kvasnic.
- Ze synchronizovaného chovu pomocí exhaustoru odeberte 10 juvenilů (dávejte pozor na správný počet!) a vyklepte je do testovací nádoby s půdou.
- Nádoby uzavřete víčky a poté zvažte.
- Nádoby umístěte do inkubační místnosti (teplota 20 ± 2 °C).
- Každý týden nádoby zvažte a porovnejte váhu s původní. V případě úbytku váhy doplňte vodu.
- Každý týden dosypte špetku kvasnic.

Vyhodnocení testu:

- Po 28 dnech vyhodnoťte mortalitu a reprodukci pomocí flotační metody.
- Do testovací nádoby nalijte vodu z kohoutku a opatrně promíchejte do rovnoměrné suspenze pomocí štětečku.
- Poté beze zbytku přelijte suspenzi do počítací nádoby (zbytky půdy můžete vypláchnout několikrát vymočením vodou).
- K suspenzi kápněte pár kapek inkoustu a opět opatrně zamíchejte štětečkem.
- Počítací misku vložte do fotografické komory a vyfoťte vodní hladinu digitálním fotoaparátem.
- Natavení foťáku: po zapnutí nastavte focení na auto, v přední části foťáku zmáčkněte tlačítko pro makro (symbol kytičky) a fotografování bez blesku (symbol přeškrtnutého blesku).
- Na fotkách spočítejte počet dospělců a juvenilů.

DOMÁCÍ ÚKOL B6

Otázky k provedení zkoušky inhibice reprodukce chvostoskoků *Folsomia candida*

Cíl úkolu B6: Porozumění principu provedení půdního biotestu s chvostoskoky *Folsomia candida*

Vypracovat do: Zodpovězené otázky v MS Word zasílejte **do pondělí 23.3.2015** na zuzana.tousova@seznam.cz

Skupiny: práce ve dvojici → úkol odevzdává každá dvojice pro svou látku

Přesné zadání úkolu:

Zodpovězte tyto otázky:

1. Jak se provádí synchronizace chovu chvostoskoků?
2. Jak dlouho před založením testu je třeba synchronizaci provést?
3. Proč se synchronizace chovu provádí?
4. Čím se chvostoskoci během testu krmí?
5. Proč je důležité testové nádoby pravidelně vážit?
6. Jak dlouho trvá reprodukční test s chvostoskoky?

BLOK 7

Termín: **ČT 23.4.2015: 9-11. 2 hod.**

Obsah:

Ukončení kontaktního půdního biotestu s chvostoskoky.

Zadání úkolu B7

Příprava na blok 7:

Přečtete si znovu **STUDIJNÍ MATERIÁL 4 – Návod k provedení Zkoušky inhibice reprodukce s chvostoskokem *Folsomia candida*** (Str. 43)

Úkoly navazující na blok 7:

DOMÁCÍ ÚKOL B7 do čtvrtka 7.5.2015, zadání na str. 47

DOMÁCÍ ÚKOL B7

Vypracování protokolu k půdnímu biotestu s chvostoskoky *Folsomia candida*

Cíl úkolu B7: Vyhodnocení a interpretace výsledků půdního biotestu s chvostoskoky *Folsomia candida*

Vypracovat do: Vypracovaný úkol v MS Word zasílejte **do čtvrtka 7.5.2015** na zuzana.tousova@seznam.cz

Skupiny: práce ve dvojici → úkol odevzdává každá dvojice

Přesné zadání úkolu:

Podělte se s ostatními dvojicemi o výsledky půdního biotestu tak, abyste měli pro vypracování protokolu výsledky všech testovaných koncentrací kadmia. Poté vypracujte protokol o laboratorním testu s následujícími náležitostmi (obdobně jako v DOMÁCÍM ÚKOLU B5):

Hlavička	Datum založení, datum ukončení, jména studentů
Princip úlohy	Krátký stručný popis principu metody na základě lab. manuálu
Postup	Krátký stručný popis postupu
Výsledky	Tabulka hodnot (tabulka je podkladem grafu) – pro každý endpoint (součástí tabulky by měl být průměr, směrodatná odchylka, CV% pro každou koncentraci a kontrolu) Graf v Excelu – pro každý endpoint – spojnicový se značkami, na ose x – koncentrace jako kategorie, na ose y odpověď (%I) + SD – pěkný, přehledný, smysluplný Graf v Graphpadu pro každý endpoint – na ose x log koncentrace na ose y odpověď (%I) + SD, pro zobrazení proložení vašich výsledků sigmoidní křivkou dávka-odpověď Výsledné hodnoty IC (EC,LC) 50 a 20; NOEC, LOEC – pro každý endpoint (pokud lze spočítat, pokud nelze krátce popsat proč)
Diskuze a závěry	Stručný slovní popis = interpretace výsledků. Důležité je uvést všechny okolnosti, zajímavosti a pozorování, které mohly nějakým způsobem ovlivnit vaše výsledky.