

# ŘASOVÉ TESTY TROFIE A TOXICITY

<sup>1</sup>Blahoslav Maršálek,

<sup>1</sup> RECETOX, Kamenice 126/3, 625 00 Brno a Botanický ústav AVČR, Květná 8, 603 65 Brno,  
[Marsalek@brno.cas.cz](mailto:Marsalek@brno.cas.cz)

## Základní použití a rozdělení:

Řasy jako zástupci primárních producentů ve vodních ekosystémech hrají v ekotoxikologickém testování významnou roli. Řasové testy toxicity a trofie však vyžadují určité vybavení a materiální i odborné zázemí laboratoře. Přesto jsou tyto testy používány i v případech, kdy nemají opodstatnění a bylo by možno použít biotest s jinými producenty (např. pro testování půdy).

Rozlišujeme řasové testy trofie a toxicity s **mořskými řasami** (Algal marine bioassay, ISO 10253, používající rozsivku *Phaeodactylum tricorutum*), nebo testy toxicity a trofie s **sladkovodními řasami** (ISO 8692, OECD 201).

Další členění těchto testů je **dle průtočnosti systému**: klasické ISO normy jsou uvažovány jako statické, publikovány jsou systémy průtočné a poloprůtočné. [1] RADETSKI A FERARD 1995.

Další členění je dle toho, zda používáme jednodruhové kultury, nebo **tzv. multispecies test**, který pracuje se zástupci zelených řas, rozsivek a sinic o známých abundancích na začátku testu.

**Nejvíce variability lze nalést v desingu a způsobech vyhodnocování** řasových testů trofie a toxicity: klasický test probíhá v 250 ml E-baňkách, publikovány a SOP normované verze jsou známy jako zkumavkové, kyvetové, kádinkové, ve scintilačních epruvetách, v serologických destičkách na pevných půdách, v suspenzích atd. – přehled viz doktorské práce [2]ROJÍČKOVÁ- PADRTOVÁ (1998) a [3]DVOŘÁKOVÁ (1999), které se věnovaly řasovým testům a kde jsou citovány i předchůdci citovaných testů (např. test s vláknitou řasou *Cladophora* dle Cyruse 1954 [4]) a jsou k dispozici na brněnském pracovišti BU.

Cílem tohoto příspěvku je komentovat vybrané body standardního testu ISO 8692, upozorňovat na úskalí a nabídnout alternativy.

## Podstata řasového testu trofie a toxicity ISO 8692

Česká republika přijala mezinárodní normu ISO 8692 (1987) jako svoji ČSN EN 28692.

**Předmětem normy je metoda stanovení toxických účinků chemických sloučenin na růst planktonních sladkovodních řas.** Metoda je použitelná pro látky snadno rozpustné ve vodě, které se výrazně nerozkládají nebo nevyklučují ze zkoušeného systému.

**Princip:** Vzorek (zkoušená voda, roztok zkoušené látky) je po sterilizaci a naočkování zkušebním organismem potřebnou dobu kultivován. Jednodruhové řasové kmeny se po několik generací, minimálně však tři, kultivují v definovaném médiu, které obsahuje koncentrační řadu zkoušené látky a inokula, a pravidelně se měří hustota buněk. Inhibice se

měří jako snížení růstu nebo růstové rychlosti v poměru ke kontrolní kultuře za stejných podmínek.

Narostlá biomasa je nepřímo úměrné účinku toxických látek a přímo úměrné trofickému potenciálu.

Rozlišit mezi toxicitou a nízkou trofíí je možno přípravou koncentrační řady (lepší růst ve zředěném vzorku značí toxicitu) a přidavkem např. EDTA, která váže těžký kov a tím zlepší růst v této variantě.

Některé látky působí v nízké koncentraci neškodně či stimulačně, ale ve vysoké koncentraci toxicky. Např. těžké kovy jsou mikroelementy, zředěny v živném roztoku, ale jedy ve vysoké koncentraci.

### Zkušební organismus

Jako zkušební organismus lze použít tyto planktonní sladkovodní řasy:<sup>1)</sup>

a) *Raphidocelis subcapitata* (KORŠ.) NYGAARD et al. (*Selenastrum capricornutum*), kmen SKULBERG 1959/1 (doporučuje se pro srovnatelnost výsledků v mezinárodním měřítku);

b) *Chlorella kessleri* FOTT et NOVÁK., kmen LARG/1;

c) *Scenedesmus subspicatus* CHOD., kmen LAPAILEUR/Camb. 276-20;

d) *Scenedesmus 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.

### Příprava inokula

Řasové inokulum pro zkoušku se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury.

Inokulační kultura se nasadí k předkultivaci 2 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 2 dny provzdušňuje a udržuje při světelné intenzitě 30 W/m<sup>2</sup>(6000 lx) a teplotě (30 ± 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.

### Živiny a jejich roztoky

Je předepsáno standardní testovací medium. Podstatná je koncentrace dusíku a fosforu, mikroprvků, EDTA a forma dodání uhlíku. Zdrojem C je v ISO 8692 přírůstek NaHCO<sub>3</sub>. **Tento způsob zásobení C je však evidentně slabým místem této normy a přivedl ji do "pH pasti"**.

V samotném znění normy jsou rozpory: Na str.12 se požaduje přírůstek hydrouhličitanu a úprava pH zásobního roztoku živin na 8,3. Tato úprava pH je zbytečná, zásobní roztok se 8x ředí, obohacuje různými koncentracemi testované látky či výluhu a nakonec inokulem; pH by se tedy mělo měřit a event. nastavovat až na začátku testu, v kultuře. Na str.14 však:

"Obvykle se zkouška provádí bez stanovení pH...Ke zjištění toxického působení, které není způsobeno pH, se upraví pH prvního zásobního roztoku na pH 7,0..".

Zvýšení hodnoty pH na 8,3 však je i podmínkou využití C z hydrouhličitanu v kultuře a dále vlastně důkazem příjmu C a zdravého průběhu fotosyntézy. Pokud se hydrouhličitan

přidá do kultury a pH se upraví na 8,3 pak je provzdušňování zbytečné, naopak se jím sníží pH a hydrouhličitan nemůže být využit.

**Řasy jsou většinou schopny využívat jako zdroj C nejen CO<sub>2</sub>, ale i hydrouhličitan, výsledkem i podmínkou je ale alkalizace média** [7]HIRAIWA, GOYAL ET TOLBERT 1993. Zvýšení pH o více nežli 1,5 však norma ISO 8692 považuje za důvod neplatnosti testu (str.16). Přitom limitace CO<sub>2</sub> nastupuje v kulturách již kolem výtěžku sušiny kolem 200 mg.l<sup>-1</sup>, světlem až kolem 2 000 mg.l<sup>-1</sup>.

Důvody pro eliminaci změn pH jsou správné, neboť **pH může měnit toxicitu těžkých kovů** a to snižovat i zvyšovat.

Snaha o zásobení řas C z hydrouhličitanu tedy zavádí ISO 8692 do slepé uličky. Hydrouhličitan vyžaduje zvýšení pH nad 8,3 aby mohl být využit, další zvýšení je nezbytným následkem fotosyntézy, zároveň však je zvýšení o více nežli o 1,5 důvodem pro zrušení výsledku. Protismyslně u vzorků, kde fotosyntéza probíhá a vzorek tedy neobsahuje toxickou látku je výsledek zrušen!

### **Kultivační nádoby**

Standardní test doporučuje E-lahve o objemu 250 ml. Tato technika kultivace u ISO 8692 je pro rozsáhlejší soubory těžkopádná a náročná na práci. Tato i další klasické procedury doporučují kultury o objemu 100-500 ml, což klade velké nároky na prostor a investice (klimatizace, temperace lázní I místnosti. Takto velké objemy jsou ale vlastně zbytečné, pro stanovení počtu buněk či optické hustoty i sušiny jsou třeba řádově jen ml suspenze.

Především se nabízí myšlenka kultury miniaturizovat a dosáhnout tak zvětšení počtu variant a opakování i úspory provozní. Dále pak vynechat přídavek hydrouhličitanu a sytit kultury plynným oxidem uhličitým. Odpadne tím nutnost úpravy pH vzorků i následná alkalizace. Pro laboratorní účely cena CO<sub>2</sub> není podstatná.

Miniaturizace šla cestou od E-lahví, přes 2- 10-15 ml zkumavky, 5-10cm kyvety, 5-10 ml scintilační epruvety, 1ml jamky 12-24 jamkové destičky na tkáňové kultury až po serologické destičky s objemem 0,2 ml.

### **Inkubace**

Destičky se inkubují v kultivačním zařízení při optimální teplotě pro testovací organismus (*Raphidocelis* 28 °C při světelné intenzitě 30 W/m<sup>2</sup> (6-9.000 lux). Nižší teplota uváděná na úrovni 24°C je od optima poněkud vzdálena a je neopodstatněná. Také formulace min. 4000 lux. je nepřijatelná, protože při světelných intenzitách nad 10.000 lux. dochází k fotoinhibici, především v prvním dni kultivace. Dále se různá provedení řasových testů toxicity a trofie liší v způsobu míchání kultur: rozlišujeme testy stacionární, probublávané sterilovaným vzduchem s přídavkem CO<sub>2</sub>, nebo bez), třepané na třepáčkách, nebo magneticky míchané. Cílem je udržet buňky řas v maximálním kontaktu s toxikantem a zdrojem živin, nevýhodou může být možnost kontaminace např. při probublávání nesterilním vzduchem.

### **Vyhodnocování testu - Měření růstu**

Výsledky lze vyjadřovat pomocí metod přímých a nepřímých:

Mezi přímé metody patří kvantifikace počtu buněk (mikroskopicky, flow cytometricky), gravimetricky, objemovou biomasou (centrifugací v kalibrovaných zkumavkách).

Mezi nepřímé metody kvantifikace biomasy, která narostla v průběhu řasového testu patří: stanovení spalného tepla na mikrok calorimetru, CHN analýza, kvantifikace chlorofylu a spektrofotometricky, nebo pomocí fluorescence chlorofylu, kvantifikace enzymatické aktivity ( esterázy, galaktosidázy, hydrogenázy, RUBISCO), stanovení rychlosti příjmu klíčových

živin (úbytek dusičnanových iontů z roztoku selektivní elektrodou), hodnocení fotosyntetické asimilace – produkce O<sub>2</sub>, spotřeba CO<sub>2</sub> (plynovou chromatografií, nebo jako <sup>14</sup>C, nepřímo, leč poměrně citlivě lze využít změnu pH roztoku pH indikátory, nebo pH metrem viz [9] LUKAVSKÝ, A MARŠÁLEK (1997).), analýza dynamiky fluorescence Kautského kinetikou atd. V současné době existují desítky způsobů vyhodnocování řasových testů toxicity a trofie, které popisují stovky publikací. Přehled těchto metod není předmětem tohoto sdělení, podrobnosti autoři rádi sdělí.

Je jisté, že každá metoda má své výhody i nevýhody a má různé uplatnění pro různé typy vzorků. Např. u přírodních vzorků je důležité zohlednit především zákal a zabarvení, proto je vhodné při používání běžně rozšířené metody vyhodnocení pomocí optické hustoty promyslet alternaci například s druhou nejrozšířenější metodou – počítání buněk pod mikroskopem v potřebných intervalech (1 den až 5 dní, 14-21 dní v případě spec. testů trofie) se měří přírůstky biomasy řas. Nejčastěji se počítají buňky pod mikroskopem, nebo se měří absorbance v jamkách při 750 (680) nm do dosažení konstantní hodnoty (stacionární fáze růstové křivky). Tato hodnota se přepočte na výtěžek sušiny (podle konverzních křivek). Obsah jamek je také možné pipetou přenést do kyvety běžného spektrofotometru a proměřit

### Výpočet EC<sub>50</sub>

#### Výpočet integrálu biomasy A:

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

$t_1, t_2, t_{n-1}, t_n$  = 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

#### Hodnocení EC<sub>50</sub> pomocí růstových rychlostí $\mu$ :

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:

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

$\mu_c$  = růstová rychlost kontrolního vzorku

$\mu_i$  = růstová rychlost sledované koncentrace

Hodnoty  $EC_{50}$  se počítají pomocí **probitové analýzy** podle následujícího postupu:

1. K získání přesné hodnoty je potřeba nejméně 5 pozorování v rozmezí 5 – 95% inhibice.
2. Koncentrace látky se logaritmuje ( $\log c$  nebo  $\ln c$ ).
3. Inhibice se vyjádří v procentech, tyto hodnoty se převedou na probity.
4. Získané hodnoty se vynesou do grafu, kde na ose x leží jednotlivé logaritmy koncentrace a na ose y odpovídající probity.
5. Vynesenými body se proloží přímka. Odečte se hodnota logaritmu koncentrace, při které je probit rovný 5 (tj. při 50% inhibici).
6. Odlogaritmováním se získá hledaná koncentrace  $EC_{50}$

Celý postup je možné automatizovat pomocí počítačového programu

### Stanovení trofického potenciálu

Trofický potenciál se určí odečtením sušiny biomasy v kontrolním vzorku od sušiny biomasy ve vzorku vody. [8]LUKAVSKÝ a kol. 1995

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 stupnice	Katarobní	Ultraoligo	Oligo	Oligomezo	Mezo	Mezoeutro	Eutro	Poly	Hypertrofni
Sládeček 1979	<5	<25	<50	<100			<500	<3 000	
Žáková 1980	<5		5-50	50-200			200- 500	500- 1 000	>1 000
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, např. podle schématu: vzorek (bez obohacení)

2 ml vzorku + 50  $\mu$ l roztoku (konečná koncentrace fosforu 0,05 mg/l)

2 ml vzorku + 50  $\mu$ l roztoku (konečná koncentrace dusíku 1 mg/l)

2 ml vzorku + 50  $\mu$ l roztoku + 50  $\mu$ l roztoku (konečná koncentrace fosforu 0,05 mg/l a dusíku 1 mg/l)

vzorek + další prvky (koncentrace se vypočítají z živného roztoku).

Roztoky se sterilizují v množství 2 ml v otevřených Petriho miskách 2 hodiny ve sterilizačním zařízení (viz příloha B). Sterilní roztoky se přelívají do sterilních lékovek.

### **Stanovení podílu vázaných živin**

Podíl živin vázaných v sestonu je možno stanovit porovnáním trofického potenciálu nefiltrovaného vzorku se vzorkem, z něhož byl seston odstraněn filtrací nebo odstředěním.

### **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;
- d) 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;
- e) výsledky:
  - 1) absorbance v jamkách sérologické destičky v každé fázi měření;
  - 2) sušina biomasy v jamkách sérologické destičky ve stacionární fázi růstové křivky;
  - 3) hodnoty EC<sub>50</sub>;
  - 4) hodnoty trofického potenciálu;
- f) další skutečnosti významné z hlediska užitého postupu.

**Tab.2. Srovnání pořadí toxicity těžkých kovů pro některé řasy.**

Řasa	Pořadí toxicity
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (TURP.) BREB.	Cd >Pb>Cu>Ni>Zn
<i>Sc. quadricauda</i> (TURP.) BREB	Cu>Ni>Cd>Pb>Zn>Co>Cr
<i>Sc. quadricauda</i> GREIFSW./15	Cd>Cr>Al>Co>Ni>Cu>Pb>Zn>Fe
<i>Sc.subspicatus</i> LEPAIL./Cambr.276-20	Cd>Cr>Al>Co>Ni>Cu>Zn>Pb>Fe
<i>Scenedesmus</i> sp.	Cd>Ni>Se>Cu>Pb
<i>Raphidocelis subcapitata</i> SKULB./1959/1	Cu>Ni>Co>Cr>Cd>Zn
<i>R.capitata</i> SKULBERG/1959/1	Cd>Cu>Co>Cr>Al>Ni>Pb>Fe>Zn
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd>Cu>Hg>Zn>Pb
<i>Chl. kessleri</i> LARG/1	Cu>Cr>Al>Cd>Zn>Co>Ni>Pb>Fe
<i>Chl. protothecoides</i> KRUGER [pH 6.5]	Hg>Th>Cu>Cr>Se>Cd>Ni>Co
<i>Chl. saccharophila</i> KRUG.)MIGULA. [pH 6.5]	Se>Cu>Hg>Th>Cr>Cd>Ni>Co.
<i>Chl. saccharophila</i> KRUG.)MIGULA	Cu>Zn>Cd>Pb
<i>Chlorella</i> sp.	Cd>Cu>Ni>Co>Pb
<i>Stichococcus bacillaris</i> NAEG. [pH 6.5]	Hg>Cu>Se>Th>Cr>Ni>Co>Cd
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Cu>Hg>Pb>Cd
<i>Cladophora glomerata</i> L(KUTZ.)[pH 5.5]	Cr>Pb>Cu>Cd>Ni>Co>Zn
<i>Cl. glomerata</i> L(KUTZ [pH 8.5]	Cr>Pb>Zn>Cu>Cd>Ni>Co
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> BOHL.	Hg>Cu>Pb>Cd

### Další metodiky a alternativy řasových testů toxicity

Standardní test toxicity prováděný v 250 ml Erlenmayerových baňkách je značně neekonomický, a proto byly vypracovány miniaturizované metody, které dnes již nejsou považovány za druhořadou alternativu, ale za určitých podmínek dávají zcela srovnatelné výsledky. Standardizovaná metoda řasového mikrobiotestu je součástí také českých oborových norem vodního hospodářství TNV 75 7741 [8] LUKAVSKÝ a kol. 1995. Alternativní testy pak mohou probíhat na sérologických destičkách, v kyvetách, zkumavkách atd. viz práce [2] ROJÍČKOVÁ- PADRTOVÁ (1998) a [3] DVOŘÁKOVÁ (1999),

#### **Metodika řasového mikrobiotestu**

Celý test probíhá za sterilních podmínek. Jako testovací organismus se využívají řasy *Raphidocelis subcapitata*, *Chlorella kessleri*, *Scenedesmus subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda* a *Chlamydomonas reinhardtii*. Řasa je předkultivována (3 dny) a je připraveno inokulum o koncentraci  $4 \cdot 10^5$  buněk/ml. Do jamek s testovaným roztokem se přidá řasové inokulum tak, aby jeho výsledná hustota byla  $10^4$  buněk/ml. Na jedné destičce lze testovat devět koncentrací v šesti opakováních, jeden sloupec je vždy kontrola. Destičky se inkubují při 28-32 °C, při světelné intenzitě 30 W/m<sup>2</sup> a při 2% objemových CO<sub>2</sub>. Test se vyhodnocuje spektrofotometricky při 750 nm nebo 680 nm, určí se procento inhibice a pro zkoušenou látku se vypočte EC50 (TNV 75 7741, 1995). Hodnotit lze také počet buněk počítačem částic [9] BLAISE ET AL. 1986.

- Srovnání se standardním testem, reprodukovatelnost

BLAISE ET AL. (1986) ověřili shodu řasového mikrobiotestu na destičkách se standardním testem toxicity v baňkách při testování 25 odpadních vod a 6 kovů (s řasou *Raphidocelis subcapitata*). Výsledky testování devíti herbicidů na destičkách a v baňkách se také poměrně dobře shodovaly [10] BLAISE 1993. Dobrá korelace mezi výsledky obou řasových testů byla demonstrována pro fenol, některé kovy a herbicidy [11] St. LAURENT ET AL. 1992. Řasový mikrobiotest má dobrou reprodukovatelnost - intralaboratorní koeficient variance je mezi 11-41% [9] BLAISE ET AL. 1986, [12] THELLEN ET AL. 1989. Dle našich zkušeností klasická a miniaturizovaná metoda nejsou přímo srovnatelné, vedle různého průniku světla a CO<sub>2</sub> do

kultur, hlavně proto, že růstové křivky nejsou časově synchronizovány. Např. exponenciální fázi prochází kultura v E-baňce v čase kolem 60-90 hodin v mikrodestičce kolem 80-110 hodin. Konečný výsledek tj. letální koncentrace dané látky vyjdou však shodně.

- Využití a výpovědní hodnota

Mikrobiotest je využíván především pro testování kovů, herbicidů, případně organických látek. Vhodné je i jeho využití při testování odpadních vod, povrchových nebo podzemních vod. Dle zkušeností není příliš vhodný pro testování vzorků, které mají zákal nebo zbarvení (např. extrakty z půd a tuhých odpadů), nebo vzorků, které vykazují silnou stimulaci řasového růstu (možnost překrytí toxicity). V takovémto případě lze spektrofotometrická měření alternovat jinou metodikou vyhodnocení (viz níže).

### Další alternativy řasových testů toxicity

Při testování zakaleného nebo zbarveného vzorku lze testy vyhodnotit počítáním buněk pod mikroskopem nebo použitím počítače částic [13] REHNBERG ET AL. 1982, [14] BUTTERWICK ET AL. 1982) nebo lze využít hodnocení metabolické aktivity řas. Nejčastěji jsou využívány markery procesů spojených s fotosyntetickou asimilací, procesy přenosu přes membrány a aktivita klíčových enzymů. V souvislosti s fotosyntetickou asimilací jsou měřeny parametry příjmu oxidu uhličitého, výdeje kyslíku titrací nebo chromatograficky [15] Poskuta 1991, změny v obsahu intracelulárního ATP [16] HICKEY ET AL. 1991. Další jednoduchá a vhodná cesta využívá fakt, že řasy svou metabolickou aktivitou zvyšují pH svého okolí. To lze velmi jednoduše měřit pH metrem v biosenzoru s imobilizovanými řasami [17] LUKAVSKÝ A MARŠÁLEK, 1996.

Další metodický přístup využívá přirozené fluorescence chlorofylu, která je přímo úměrná hladině stresových faktorů a toxikantů [18] SAMSON A POPOVIC 1988. Dříve hojně využívaný <sup>14</sup>C-asimilační test [19] NYHOLM A DAMGAARD 1990 je postupně nahrazován fluorescenčními markery jako například fluoresceindiacetátem (FDA), který vykazuje vysokou korelaci s fotosyntézou [20] GALA A GIESY 1994. FDA je lipofilní nepolární a nefluorescentní molekula, která rychle proniká buněčnou plasmatickou membránou. Uvnitř buňky je FDA hydrolyzován nespecifickými esterázami, což vyústí ve vznik fluorescentního aniontu fluoresceinu. Fluorescein je hydrofilní a zůstává při neporušené buněčné membráně. Proměnnou pro kvantifikaci životnosti po obarvení FDA je buďto celková zelená fluorescence emitovaná buněčnou suspenzí a měřená spektrofluorometrem nebo množství zeleně fluoreskujících buněk v této suspenzi stanovených epifluorescenční mikroskopií nebo flow cytometrem [21] ST-LAURENT A BLAISE 1995.

- Metodika barvení FDA

Fluorescein diacetát se připravuje ředěním v acetonu nebo dimetylsulfoxidu. Řasa se inkubuje s testovanou látkou 5 hodin. Poté se FDA smíchá s řasou, jako blank se smíchá řasa s ředící organickou látkou a voda s FDA. Délka inkubace je různá (4-60 minut) a může probíhat na mikrotitračních destičkách nebo ve zkumavkách. Obarvené buňky jsou excitovány světlem z argonového laseru (488 nm) a měří se zelená (530nm) fluorescence a červená (> 620 nm) autofluorescence. Množství živých zeleně fluoreskujících buněk ve směsi je stanovováno epifluorescenční mikroskopií nebo flow cytometrem [22] BERGLUND A EVERSMAAN 1988, [23] GILBERT ET AL. 1992, [24] GALGANI ET AL. 1992.

- srovnání se standardním testem



Měření letality řasových buněk za pomoci flow cytometrie bylo srovnáno s růstem řasových kolonií na agarových plotnách (CFU). Mezi oběma metodami byla doložena vysoká korelace a nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Barvení buněk pomocí FDA je spolehlivá metoda k odlišení živých a mrtvých buněk [21] ST-LAURENT A BLAISE 1995.

Byly srovnávány EC50 z vyhodnocení životnosti buněk po obarvení FDA za 48 hodin s 96 hodinovou EC50 pro růstovou rychlost. Obě metody měly podobné EC50 pro algicidní surfaktant dodecyl sulfát sodný, ale buněčná životnost byla méně citlivá k působení herbicidu atrazinu, který je algistatický. Na rozdíl od růstové rychlosti, byla flow cytometrie schopna rozlišit mezi algicidními a algistatickými toxikanty [20] GALA A GIESY 1990.

### **Zhodnocení a použitelnost alternativ řasových testů toxicity**

Testy toxicity využívající řasy mají nezastupitelné místo v ekotoxikologickém testování. Jejich specifčnost je také v tom, že během doby expozice (3-4 dny) je toxickému vlivu vystaveno 4-5 generací populace, takže se v případě řas častěji hovoří o subchronickém testu než o testu akutní toxicity.

Pro monitoring životního prostředí je vhodnější využít miniaturizované řasové testy, neboť mají výpovědní hodnotu identickou s tzv. konvenčními testy a navíc mají podstatně vyšší produktivitu, která je vhodná pro velkoplošný monitoring.

Řasové testy trofie a toxicity by měly být používány především pro testování látek, které se dostanou do vody, monitoring povrchových, podzemních a odpadních vod a vodních ekosystémů. Je však málo pochopitelné, když jsou tyto testy používány na testování vzorků půdy, kde máme možnost využít testů toxicity s terestrickými producenty.

### **Literatura**

- [1] RADETSKI, C. M., J. F. FERARD (1995). "A Semistatic Microplate-Based Phytotoxicity Test." *Environmental Toxicology and Chemistry* Vol 14(Iss 2): pp 299-302
- [2] ROJÍČKOVÁ-PADRTOVÁ R.: *Algal assays*. PhD. Thesis. MU Brno, 1999.  
DVOŘÁKOVÁ, D: *ŘASOVÉ TESTY TOXICITY*. VŠVF, BRNO, 1999
- [3] DVOŘÁKOVÁ D. (1999) *Řasové testy toxicity*. Doktorská disertační práce, VŠVF Brno, 89s.
- [4] CYRUS, Z.(1954): Otázky biologického čištění odpadních vod. *Péče o čistotu vod* 3:161-169.
- [5] DVOŘÁKOVÁ, D., R. ROJÍČKOVÁ-PADRTOVÁ, MARŠÁLEK B. (1999). "Is the Replacement of *Scenedesmus quadricauda* L. by *Selenastrum cornutum* L. in Toxicity Tests Reasonable?" *Pol. Arch. Hydrobiol.* 46(3-4): 345-352.
- [6] ROJÍČKOVÁ-PADRTOVÁ, R. AND B. MARŠÁLEK (1999). "Selection and Sensitivity Comparisons of Algal Species for Toxicity Testing." *Chemosphere* Vol 38(Iss 14): pp 3329-3338.
- [7] SHIRAIWA, M., GOYAL, A. et TOLBERT, N.E. (1993): Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake of dissolved inorganic carbon. - *Plant Cell Physiol.* 34:649-657.
- [8] LUKAVSKÝ, J., MARŠÁLEK, B. & FREMROVÁ, L. (1995): Mikrometoda stanovení toxicity a trofického potenciálu řasovým testem. - *Odvětvová technická norma vodního hospodářství TNV 757741*, 15pp.
- [9] LUKAVSKÝ, J. AND B. MARŠÁLEK (1997). "The Evaluation of Toxicity by a Biosensor with Immobilized Algae." *Algological Studies* **85**: 147-155.

- [9] C. BLAISE, R. LEGAULT, N. BERMINGHAM, R. VAN COILLIE AND P. VASSEUR(1986).: A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Tox. Assess.* 1, 261-281
- [10] C. BLAISE(1993).: Practical laboratory application with microalgae for hazard assessment of aquatic contaminants. In: M. Richardson (Ed.) *Ecotoxicology monitoring*, VCH Basel, p. 384
- [11] D. ST-LAURENT, C. BLAISE, P. MACQUARRI, R. SCROGGINS AND B. TROTTIER (1992).: Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 7, 35-48
- [12] C. THELLEN, C. BLAISE, Z. ROY AND C. HICKEY(1989).: Round robin testing with the *Selenastrum capricornutum* microplate toxicity assay. *Hydrobiologia* 188/189, 259-268
- [13] B. G. REHNBERG, D. A. SCHULTZ AND R. L. RASCHKE(1982).: Limitations of electronic particle counting in reference to algal assays. *J. WPCF* 54, 181-186
- [14] C. BUTTERWICK, S. I. HEANEY AND J. F. TALLING(1982).: A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. *Br. phycol.* 17, 69-79
- [15] J. W. POSKUTA: (1991). Toxicity of heavy metals to growth, photosynthesis and respiration of *Chlorella pyrenoidosa* cells grown either in air or 1% CO<sub>2</sub>. *Photosynthetica* 25, 181-188
- [16] C. W. HICKEY, C. BLAISE AND G. COSTAN: (1991) Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 6, 383-403.
- [17] J. LUKAVSKÝ AND B. MARŠÁLEK: (1996) The evaluation of toxicity by biosensor with immobilized alga *Selenastrum capricornutum*. *Algol. Stud.* 89, 234-239,
- [18] G. SAMSON AND R. POPOVIC: (1988). Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Saf.* 16, 272-278
- [19] N. NYHOLM AND B. M. DAMGAARD: (1990). A comparison of the algal growth inhibition toxicity test method with the short term <sup>14</sup>C-assimilation test. *Chemosphere* 21, 671-679
- [20] W. R. GALA AND J. P. GIESY(1994): Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 831-840.
- [21] D. ST-LAURENT AND C. BLAISE: (1995), Validation of a microplate-based algal lethality test developed with the help of flow cytometry. In: M. Richardson (Ed.) *Environmental Toxicology Assessment*, Taylor & Francis, London, UK pp. 137-155.
- [22] D. L. BERGLUND AND S. EVERSMAN (1988).: Flow cytometric measurement of pollutant stresses on algal cells. *Cytometry* 9, 150-155
- [23] F. GILBERT, F. GALGANI AND Y. CADIOU (1992): Rapid assessment of metabolic activity in marine microalgae: application in ecotoxicological tests and evaluation of water quality. *Mar. Biol.* 112, 199-205.
- [24] F. GALGANI, Y. CADIOU AND F. GILBERT (1992).: Simultaneous and iterative weighted regression analysis of toxicity tests using a microplate reader. *Ecotox. Environ. Saf.* 23, 1-7