

Cvičení ke kurzu Obecná ekotoxikologie

Nutné potřeby, které studenti přinesou s sebou do cvičení:

- Tento návod
- Poznámkový sešit, psací potřeby
- Nůžky
- Pravitko (s milimetrovým rozlišením)
- Přezůvky

Úvodní přípravné otázky: (zdroj informací pro odpovědi - materiály k přednáškám, www.google.com)

- Jaký je význam použitého organismu (= modelový zástupce rostlin) ?
- Jaké jsou praktické (ekologické) důsledky eventuálního poškození klíčení rostlin ?
- Co to je IC50 a co to je IC99 ? Proč se používá právě IC50 a ne například IC99 ?

Úloha A - Stanovení ekotoxicity v testu klíčení rostlin

Úvod:

Ve skleněných petriho miskách jsou semena hořčice seté umístěna na filtrační papír a exponována 5 mL standardního média s různým ředěním testované látky. Jako negativní kontrola slouží varianta se semeny exponovanými jen čistému médiu.

Po ukončení experimentu se stanoví počet vyklíčených semen v kontrolách a v jednotlivých ředěních a u vyklíčených jedinců se vyhodnotí celková délka kořene. Získané výsledky lze využít pro výpočet hodnot IC50 (koncentrace zabraňující vyklíčení u 50% semen, resp. koncentrace 50% inhibující růst kořene).

Metodika testu klíčení je standardizována do podoby Guidline OECD (No. 208) a metodického pokynu MŽP ČR pro hodnocení toxicity odpadů a vodných výluhů (Test inhibice růstu kořene *Sinapis alba*, Vyhl. MŽP ČR 338/1997). Ve standardní podobě se provádí 4 dny (96 hodin). Pro účely cvičení může být doba expozice modifikována.

Materiál a chemikálie

- semena hořčice bílé *Sinapis alba* (s atestem testu klíčivosti)
- skleněné 10 cm petriho misky, pipety 10 mL, automatické mikropipety, filtrační papír, vialky pro přípravu ředění testované látky, pinzeta, laboratorní plastická folie, špičky k pipetám
- zásobní roztok standardního kultivačního média

Úloha A - Postup 1 - příprava EXPOZICE:

1) Petriho misky popište jménem, datem, koncentrací testované látky. Do takto připravených petriho misek připravte a vložte kruhové výseče z filtračního papíru - celkem připravte 14 petriho misek (2x kontrola + 3 ředění vzorku A v duplikátech + 3 ředění vzorku B v duplikátech)

2) Příprava ředění vzorku

- připravte následující koncentrace dodaného testovaného vzorku
- (vzorek A): 0.25% v/v, 0.5% v/v, 1% v/v** (do 15 mL standardního média napipetujete potřebný objem testovaného vzorku – 37,5 μL, 75 μL, 150 μL / 15 mL - změnu celkového objemu zanedbejte)
- (vzorek B): 5 mg/L, 50 mg/L, 200 mg/L** (do 15 mL standardního média napipetujeme potřebný objem testovaného vzorku – 1,5 μL, 150 μL, 600 μL / 15 mL – změnu celkového objemu zanedbejte)
- ředění proveďte v dodaném standardním médiu (roztok solí a základních živin nutných pro klíčení rostlin).

3) Připravené expoziční roztoky dávkujte do petriho misek - vždy 5 mL / misku

- u kontrol použijte 5 mL standardního média bez vzorku
- použijte jednu pipetu a postupujte od nejnižší po nejvyšší koncentraci

4) Do každé misky vložte 5 semen hořčice bílé

5) Petriho misky překryjte potravinovou fólií (zajistí cirkulaci vzduchu a omezí vypařování) a umístěte do temna do inkubační místnosti (pokojová teplota)

Úloha A - Postup 2 - vyhodnocení KLÍČENÍ:

- 1) Po ukončení expozice **spočítejte počty nevyklíčených semen** na jednotlivých miskách a zapište do tabulky.
- 2) U vyklíčených semen **vyhodnoťte délku kořene** (s přesností na milimetry) a zapište do tabulky;
- 3) Vypočítejte průměrnou hodnotu u každé varianty a hodnoty vyjádřete jako % kontroly a % inhibice (vyjádřete jako celá čísla)
- 4) Vyhodnocení IC50 proved'te pomocí lineární regrese se zahrnutím logaritmu koncentrace (Excel)
- 5) Schéma protokolu: princip, postup, výsledková tabulka, grafy pro jednotlivé sledované parametry a závěry

PROTOKOL - Cvičení z Obecné ekotoxikologie

Úloha A - TEST EKOTOXICITY KLÍČENÍ ROSTLIN:

Jména operátorů

Datum založení expozice:

Datum hodnocení:

-> délka expozice (počet dní):

| Rostlina číslo | Kontrola | Testovaný vzorek A (koncentrace % v/v) | | | Pozn. |
|----------------------------|----------|--|----|----|-------|
| | | 0.5% | 1% | 3% | |
| Celkem semen | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| Počet nevyklíčených | | | | | |
| Délky kořenů - Miska A | | | | | |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| Délky kořenů - Miska B | | | | | |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| Průměr délky kořenů | | | | | |
| % kontroly | 100 | | | | |
| % inhibice | 0 | | | | |
| | | | | | |
| IC50 - klíčení (% v/v) | | | | | |
| IC50 - růst kořene (% v/v) | | | | | |

| Rostlina číslo | Kontrola | Testovaný vzorek B (koncentrace % v/v) | | | Pozn. |
|----------------------------|----------|--|---------|----------|-------|
| | | 5 mg/L | 50 mg/L | 200 mg/L | |
| Celkem semen | 10 | 10 | 10 | 10 | |
| Počet nevyklíčených | | | | | |
| Délky kořenů - Miska A | | | | | |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| Délky kořenů - Miska B | | | | | |
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| 3 | | | | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| Průměr délky kořenů | | | | | |
| % kontroly | 100 | | | | |
| % inhibice | 0 | | | | |
| IC50 - klíčení (% v/v) | | | | | |
| IC50 - růst kořene (% v/v) | | | | | |

Otázky:

1) Který z hodnocených parametrů je citlivějším ukazatelem toxicity ?

2) Který vzorek je více toxický?

3) Jaké množství testované látky způsobí inhibici růstu kořene o 99% (vzorek A a vzorek B)?

Úloha B - Stanovení ekotoxicity v testu s planktonními producenty (test inhibice růstu zelené řasy)

Úvod:

Řasové buňky rodu *Pseudokirchneriella subcapitata* jsou v mikrotitrační 96-jamkové destičce exponovány různým ředěním testovaného vzorku (každá varianta ve třech opakováních).

Těsně po zahájení expozice (START) a po ukončení (KONEC) experimentu se na destičkovém spektrofotometru stanoví absorbance (680 nm) v jednotlivých jamkách s řasou a testovanými vzorky. Během experimentu dochází u kontrolních variant k růstu řas: hodnota rozdílu absorbancí ($dA = \text{KONEC} - \text{START}$) odpovídá celkovému růstu za daných podmínek.

Hodnoty dA jednotlivých variant se vyjádří jako % inhibice růstu (dA v kontrole=100%) a ze získaných hodnot se vypočítají hodnoty IC50 (koncentrace inhibující růst z 50%)

Metodika testu klíčení je standardizována do podoby Guidline OECD (No. 201). Pro účely cvičení bylo uspořádání modifikováno.

Materiál a chemikálie

- připravená řasová kultura *Pseudokirchneriella subcapitata* o vhodné hustotě v standardním kultivačním médiu
- mikrotitrační destička, automatické mikropipety, vialky pro přípravu ředění testované látky, špičky k pipetám
- médium pro ředění vzorků

Úloha B - Postup 1 - příprava EXPOZICE:

1) Příprava ředění vzorku

- připravte následující koncentrace z dodané testované látky ($K_2Cr_2O_7$ - dichroman draselný, koncentrace dodaného zásobního roztoku 200 mg/L): 200, 100, 50, 25, 12.5 mg/L:
- připravte si 5 mikrozkušavek - do první přeneste 400 uL zásobního roztoku a do 4 ostatních 200 uL destilované vody (vialky popište koncentracemi)
- z roztoku o nejvyšší koncentraci 200mg/L přeneste 200 uL do další vialky popsané 100mg/L s vodou a důkladně promíchejte (ředění 1:1, dojde k naředění pův.konc. na polovinu, tj. 100 mg/L), stejným způsobem připravte seriovým ředěním další nižší koncentrace

2) Expozice řas

- do 6 čistých mikrozkušavek dávkujte 950 uL řasové kultury (! kulturu před pipetováním důkladně promíchejte)
- následně k řasám pipetujte po 50 uL vody (vialka 1 - kontrola), resp. 50 uL z jednotlivých ředění připravených v předchozím bodě (tzn. z připraveného roztoku 12.5 mg/L odeberte 50uL a napipetujte do mikrozkušavky s řasama - popsané 0.625) - použijte jednu pipetu, pipetujte od nejnižší koncentrace - špičku není třeba vyměňovat.

Připravené roztoky jsou tedy výsledně 20x zředěny (50:950) a výsledné koncentrace jsou:

0 (kontrola), 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/L

- vialky s řasou a testovanou látkou důkladně promíchejte
- Z každé varianty pipetujte 4x 200 uL, vždy do 4 jamek mikrotitrační destičky (4x kontrola, poté 4x z každé koncentrace). Mikrodestičku popište jménem, datem a jamky s testovanou látkou popište odpovídajícími koncentracemi (K, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10).

3) Stanovení počáteční hodnoty absorbance pro hodnocení růstu

- na mikrodestičkovém readeru odečtete absorbanci při 680 nm
- získaný soubor (ve formátu MS-Excel) uložte na pevný disk počítače do adresáře "/ ObEkotox-cviceni/ pod názvem START-příjmení.xls, kde *příjmení* je příjmení jedné z osob ve dvojici

4) Mikrodestičku přikryjte víčkem a uchovejte v inkubační místnosti s řízeným světelným režimem

Úloha B - Postup 2 - vyhodnocení INHIBICE RŮSTU:

- 1) Po ukončení expozice zkontrolujte opticky stav růstu řas v jednotlivých jamkách mikrodestičky, případné problémy zaznamenejte
- 2) Na mikrodestičkovém readeru odečtěte absorbanci při 680 nm (KONEC)
- získaný soubor (ve formátu MS-Excel) uložte na pevný disk počítače do adresáře "/dokumenty/ObEkotox-cviceni/ pod názvem KONEC-*příjmení*.xls, kde *příjmení* je příjmení jedné z osob ve dvojici
- 2) S využitím výpočtů v připraveném souboru MS-Excel (bude k dispozici v laboratoři)
- vypočítejte průměrné hodnoty KONEC a START jednotlivých variant, vypočítejte % růstu a % inhibice ve srovnání s kontrolou (viz tabulka/protokol)
- 3) S využitím lineární regrese v Excelu vypočítejte IC50 pro inhibici růstu a zapište do tabulky.

PROTOKOL - Cvičení z Obecné ekotoxikologie

Úloha B - EKOTOXIKOLOGICKÝ BIOTEST RŮSTU ŘAS:

Jména operátorů

Datum založení expozice:

Datum hodnocení:

-> délka expozice (počet dní):

| | | Koncentrace (mg/L) | | | | |
|------------------------|--------------|--------------------|------|-----|---|----|
| | Kontrola (0) | 0.625 | 1.25 | 2.5 | 5 | 10 |
| A680 START (průměr) | | | | | | |
| A680 KONEC (průměr) | | | | | | |
| hodnota dA | | | | | | |
| % růstu | 100 | | | | | |
| % inhibice | 0 | | | | | |
| IC 50 (mg/L) | | | | | | |

Otázky:

- 1) Při které použité koncentraci látky ještě nebyl pozorován inhibiční efekt ?
- 2) Při které použité koncentraci látky již bylo možno poprvé uvidět významný inhibiční efekt ?
- 3) Jaké jsou hodnoty NOEC, LOEC a MATC ?
- 4) Jaká koncentrace způsobí inhibici růstu o 99% ?