E1241 Experimentální a aplikovaná (eko)toxikologie cvičení
Úloha: Test inhibice růstu zelené řasy *Raphidocelis subcapitata*
Datum provedení: 30. 10. – 2.11. 2023

Vypracovala: Aneta Vrzalová
UČO: 505824
Obor: Životní prostředí a zdraví

Úvod

Cílem této úlohy bylo zjistit toxicitu zkoumané látky (diuron) na želené řasy. Diuron je používán jako herbicid, tudíž jeho efekt na zelené řasy by měl být znatelný. Látku jsme testovali v koncentrační řadě vždy v pěti opakováních, provedeno v 96 jamkové mikrotitrační destičce. Hodnoceným parametrem byla inhibice/stimulace růstu. Růst byl vypočítán z optické density (680nm) řasové suspenze, která koreluje s počtem buněk na mL.

Postup

V prvé řadě jsme si nachystali roztoky námi měřených koncentrací testovaných látek. Pro diuron: 200-66,6-22,2-7,4-2,47 µg/L. Napipetovali jsme požadované množství solvent média (50% ZBB médium + 1 % MeOH) do vialek, do vialky určenou pro nejvyšší koncentraci jsme napipetovali požadované množství diuronu a trojkovým ředěním připravili nižší koncentrace. Takto připravené roztoky jsme napipetovali do jamek dle schématu (včetně řady A a H).

Jako pozitivní kontrola byl dichroman draselný. Ten jsme testovali v koncentracích: 10-5-2,5-1,25 mg/L. Do vialek jsme napipetovali 50% ZBB médium, do vialky určenou pro nejvyšší koncentraci jsme napipetovali požadované množství dichromanu draselného a dvojkovým ředěním jsme připravili nižší koncentrace. Takto připravené roztoky jsme napipetovali do jamek dle schématu (včetně řady A a H).

Změřili jsme si absorbanci řasové kultury na spektrofotometru oproti blanku. Přepočtem z rovnice jsme zjistili množství buněk a jakým faktorem bude třeba buňky naředit, abychom získali naši požadovanou hustotu 200000 buněk/mL. Naředěnou řasovou suspenzi jsme promíchali a napipetovali do vnitřních 60 jamek (dle schématu).

V čase 0, 24, 48 a 72 hodin jsme změřili absorbanci při 680 nm. Mikrodestička byla v průběhu testu při teplotě 23 °C a při osvětlení 2080 lx.

Výpočty

Provedli jsme korelaci dat na blanky, pro každou koncentrační variantu jsme vypočítali průměr, směrodatnou odchylku a koeficient variance. Z upravených dat jsme vypočítali růstovou rychlost dle vzorce:

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

kde:

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

Růstová rychlost by se měla pohybovat v intervalu 0,4-1.

Také inhibici 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

A v neposlední řadě výtěžek biomasy dle vzorce:

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

kde:
Y_k - výtěžek kontroly
Y_v - výtěžek jednotlivých variant koncentrací toxikantu

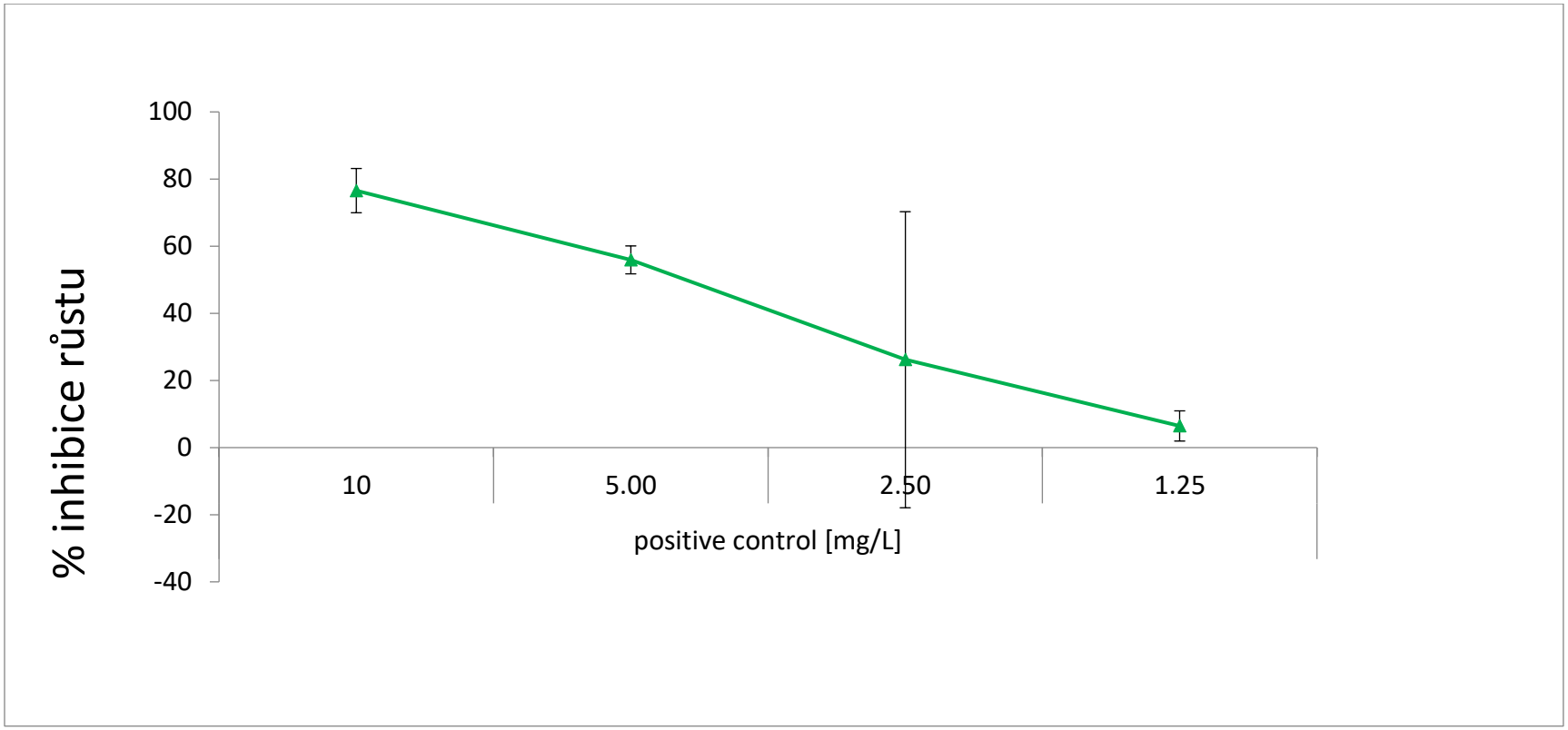
Pomocí softwaru GrafPad jsme vypočítali hodnoty IC50 a IC20 jak pro testovanou látku diuron, tak pro pozitivní kontrolu dichroman draselný.

Jako ověření citlivosti se považuje, pokud EC50 způsobená dichromanem draselným je v rozmezí 0.8-1.2 mg/L.

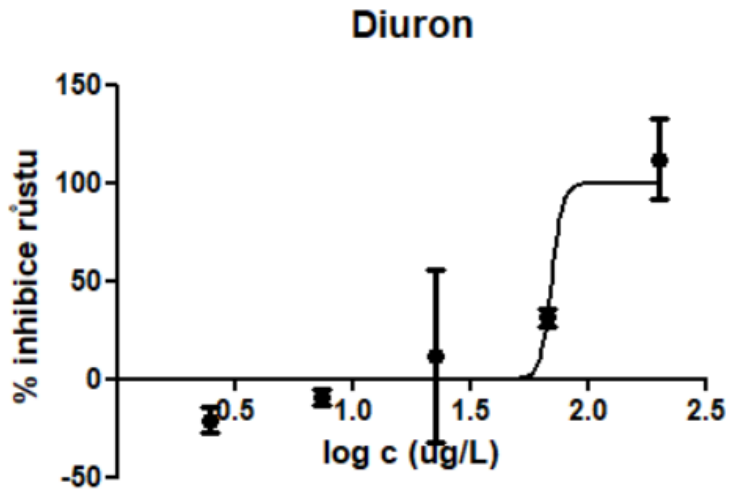
Vypracovala: Aneta Vrzalová
UČO: 505824
Obor: Životní prostředí a zdraví

Výsledky

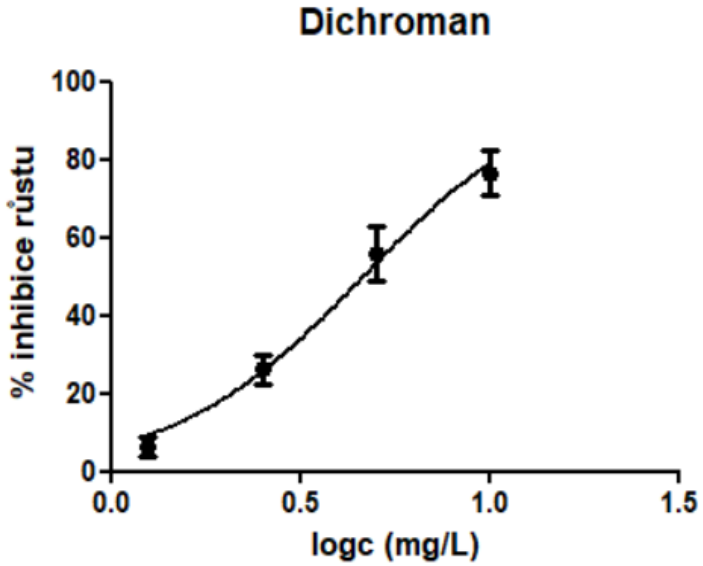
Obrázek 1: Inhibice růstu řasy po 72 hodinách pro diuron.



Obrázek 2: Inhibice růstu řasy po 72 hodinách pro pozitivní kontrolu (dichroman draselný).



Obrázek 3: Graf křivky dávka-odpověď pro diuron.



Obrázek 4: Graf křivky dávka-odpověď pro dichroman draselný.

Diuron: IC50 = 69.6 ug/L, IC20 = 64 ug/L

Dichroman draselný: IC50 = 4.62 mg/L, IC20 = 2 mg/L

Diskuse a závěr

Z Obrázek 1 lze pozorovat vzrůstající trend % inhibice se zvyšují se koncentrací diuronu. Stejné výsledky ukazuje i Obrázek 3 z GraphPedu. Hodnoty IC50 se pro diuron velmi podobají hodnotám EC50 z databáze Ecotox (67.1 ug/L), naopak z databáze Ecosar byla organickým modulem vypočítána daleko vyšší hodnota EC50 (2214 ug/L). Ovšem organický modul je postavený na K_{ow} a proto jsou tu koncentrace LC/EC50 pro sloučeniny typu diuron zpravidla (několika)řádově vyšší.

Z Obrázek 2 i Obrázek 4 lze pozorovat vzrůstající trend % inhibice se zvyšují se koncentrací dichromanu draselného. Hodnota IC50 byla vyšší, než jaká by měla pro dichroman draselný být (rozmezí 0.8-1.2 mg/L). Je možné, že naše řasy byly v tomto případě o něco odolnější.