

<b>Jméno a příjmení:</b>	Markéta Průšová
<b>Studijní program, semestr:</b>	Životní prostředí a zdraví, semestr 1
<b>Název předmětu:</b>	Experimentální a aplikovaná toxikologie a ekotoxikologie
<b>Název úlohy:</b>	Test inhibice růstu zelené řasy <i>Raphidocelis subcapitata</i>

### Princip:

Testovaným organismem je zelená řasa *Raphidocelis subcapitata*, která je po dobu 72 hodin vystavena koncentrační řadě diuronu. Diuron je neselektivní herbicid ze skupiny fenylmočovinových pesticidů. Jedná se o jeden z nejvíce aplikovaných herbicidů vůbec. Používá se také jako algicid v akváriích či jezírkách. Pozitivní kontrolou je dichroman draselný ve 4 koncentracích.

Cílem úlohy bylo stanovení změny absorbance jednotlivých jamek v čase a následné zjištění inhibice růstové rychlosti a inhibice výtěžku.

### Postup:

1. Byla připravena koncentrační řada pro diuron (1,4 – 3,7 – 11,1 – 33,3 – 100 µg/l) a pozitivní kontrolu (dichroman)
2. Bylo připraveno správně naředěné inokulum řas v 50% ZBB médiu
3. Do každé jamky bylo napipetováno 125 µl řasového inokula
4. Zbýlých 125 µl bylo doplněno do každé jamky dle pipetovacího schématu (negativní kontrola, rozpouštědlová kontrola, pozitivní kontrola (4 koncentrace, 5 opakování), jednotlivé koncentrace testované látky – diuronu)
5. Jamky byly řádně promíchány a byla měřena absorbance při vlnové délce 680 nm
6. Destička byla přikryta víčkem a exponována v inkubační místnosti s řízeným světlem
7. Po 24 hodinách byly všechny jamky řádně promíchány a byla znova změřena absorbance při vlnové délce 680 nm a následně byly destičky vráceny do inkubační místnosti
8. Tento postup byl zopakován po 48 a 72 hodinách
9. Byla provedena analýza změny absorbance v čase u jednotlivých jamek

### Výpočty:

Rovnice 1: Výpočet růstové rychlosti

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

$\mu$	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);

Rovnice 2: Výpočet inhibice růstu

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

$\mu_K$	průměr specifické růstové rychlosti kontroly
$\mu_v$	průměr specifické růstové rychlosti jednotlivých variant koncentrací toxikantu
$\%I$	procento inhibice růstu oproti negativní/rozpuštědlové kontrole v dané koncentrační variantě

### Výsledky a vyhodnocení:

U testované látky (diuronu) došlo k největší inhibici růstu v případě koncentrace 100 ug/L. Druhá největší inhibice pak připadá na koncentraci 33,3 ug/L, třetí je koncentrace 11,1. U koncentrace 3,7 ug/L a 1,4 ug/L byl dokonce pozorován přírůstek řasy (viz Tabulka 1).

V případě pozitivní kontroly (dichromanu) byla nejvyšší inhibice růstu v případě koncentrace 5 ug/L, druhá největší inhibice byla v případě 10 ug/L, následovaly koncentrace 2,5 ug/L a 1,25 ug/L.

U negativní kontroly pak došlo k větší inhibici než u koncentrace diuronu 1,4 ug/L, 3,7 ug/L a 11,1 ug/L. Jelikož se výsledky vztahují k průměrným hodnotám a u krajních jamek došlo naopak k růstu řasy, domnívám se, že inhibice růstu v prostředních destičkách negativní kontroly byla způsobena zamlžením 96jamkové destičky ve střední části víčka destičky. Nedostatek světla v inkubační místnosti mohl mít zásadní vliv na růst řasy.

Tabulka 1: Inhibice růstu řasy *Raphidocelis subcapitata* po 72 h expozici diuronem

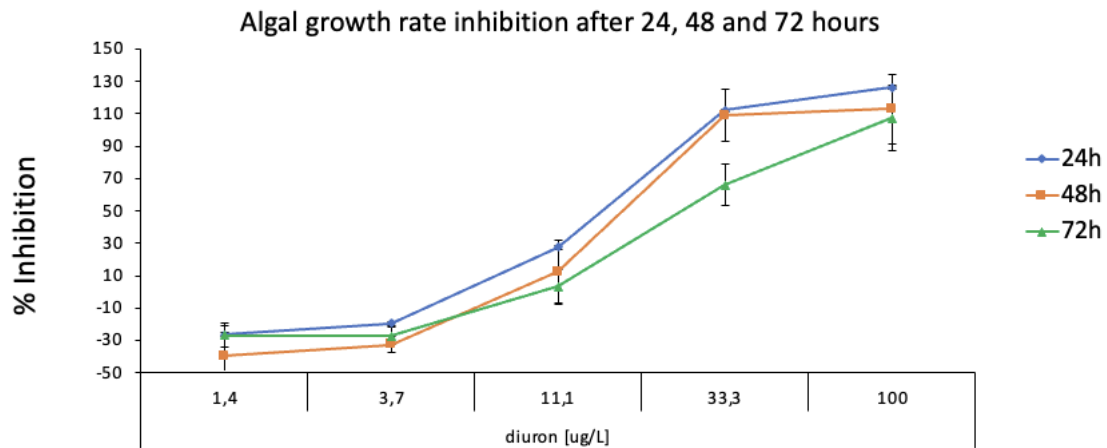
c [ug/L]	Diuron					Pozitivní kontrola - dichroman				Negativní kontrola
	1,4	3,7	11,1	33,3	100	10	5	2,5	1,25	0
Inhibice růstu řasy po 72 h [%]	-33,34	-25,44	-11,85	59,68	93,86	88,53	100,00	22,44	-1,98	1,51
	-30,97	-22,60	-0,82	66,23	122,31	88,53	133,77	40,05	7,89	15,71
	-32,04	-23,35	2,51	50,89	94,68	88,53	87,31	28,58	9,91	12,42
	-18,88	-29,51	15,81	85,34	133,77	94,68	95,31	23,40	5,96	15,49
	-18,46	-35,06	9,85	68,17	91,11	54,35	77,69	37,89	4,72	-2,24
Průměr	-26,74	-27,19	3,10	66,06	107,14	82,93	98,82	30,47	5,30	8,58

Hodnoty EC50 a EC20 jsou uvedeny v Tabulce č. 2 níže.

Tabulka 2: Vybraná data dávka-účinek

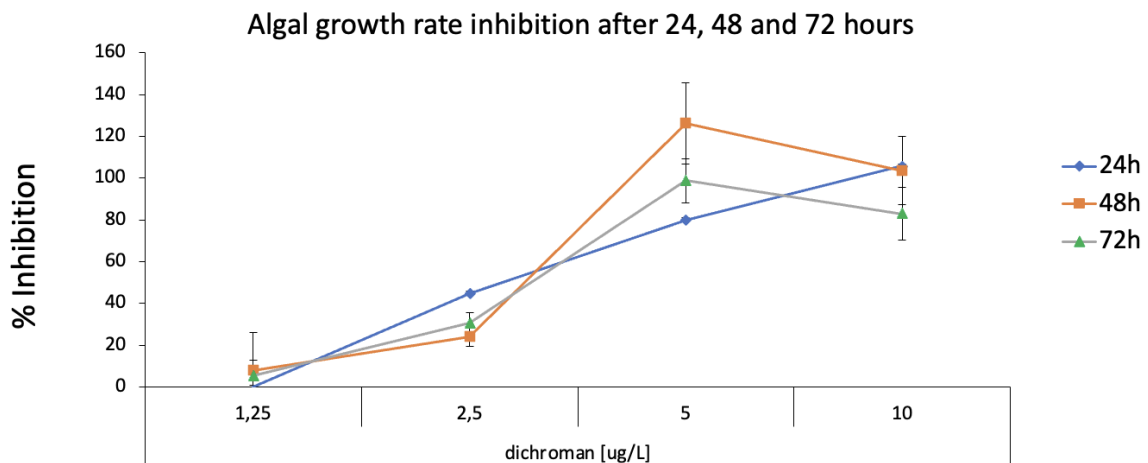
Účinek	Dávka diuronu [ug/L]
EC50	29,02
EC20	21,86

Graf č. 1 zobrazuje procentuální inhibici růstu řasy jednotlivých koncentrací diuronu po 24, 48 a 72 hodinách.



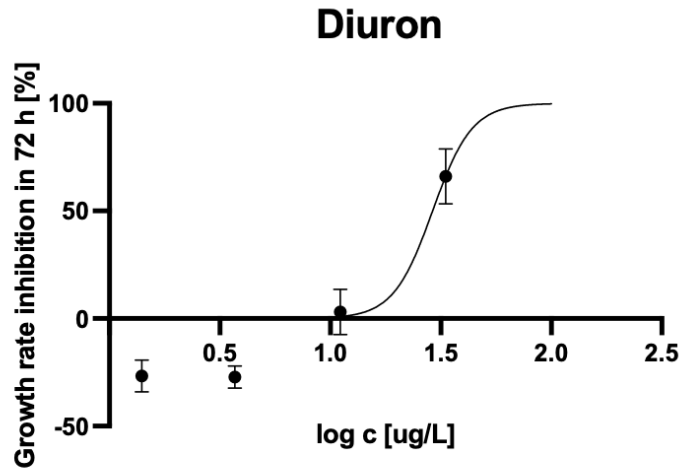
Graf 1: Inhibice růstu řasy po 24, 48 a 72 h expozici diuronem

Pro lepší porovnání s pozitivní kontrolou (dichromanem draselným) byl vytvořen graf č. 2, který zobrazuje procentuální inhibici růstu řasy koncentrační řady dichromanu v čase 24, 48 a 72 hod.



Graf 2: Inhibice růstu řasy po 24, 48 a 72 h expozici dichromanem draselným.

V grafu č. 3 je taktéž znázorněna inhibice růstu řasy *Raphidocelis subcapitata*, nicméně tentokrát ze softwaru GraphPad PRISM.



Graf 3: Závislost inhibice růstu řasy na koncentraci diuronu

#### Závěr:

K inhibici 50 % jedinců došlo při koncentraci diuronu 29,02 ug/L. V porovnání s dřívějším domácím úkolem, kde jsem mi z databáze Ecotox vyšel průměr EC50 = 49,13 ug/L jsou hodnoty nižší, nicméně neliší se příliš. Hodnoty EC jsou v mém experimentu nižší, a to pravděpodobně jelikož víčko na 96jamkové destičce bylo značně zamlžené a řasám se s omezeným světlem nedařilo tolik růst. Nyní to tedy vypadá, že je testovaná látka diuron toxičtější, než doopravdy je.