

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO
PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

POSOUZENÍ VHODNOSTI ŘASOVÝCH TESTŮ PRO HODNOCENÍ
EKOTOXICITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. IVA ŠTĚPÁNKOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

POSOUZENÍ VHODNOSTI ŘASOVÝCH TESTŮ PRO HODNOCENÍ EKOTOXICITY

THE USABILITY OF ALGAL TEST FOR EVALUATION OF ECOTOXICITY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

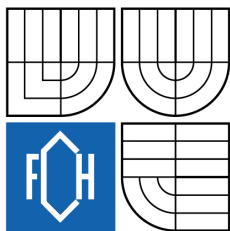
Bc. IVA ŠTĚPÁNKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. HELENA DOLEŽALOVÁ
WEISSMANNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2009



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0289/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Bc. Iva Štěpánková**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.**
Konzultanti diplomové práce:

Název diplomové práce:

Posouzení vhodnosti řasových testů pro hodnocení ekotoxicity

Zadání diplomové práce:

Posouzení vhodnosti řasových testů pro hodnocení ekotoxicity látek s ohledem na jejich metodiku.

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Iva Štěpánková
Student(ka)

Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na zhodnocení metodiky řasových testů a posouzení jejich vhodnosti pro ekotoxikologickou analýzu vybraných chemických látek. Pomocí počítání řas a jejich spektrofotometrie se posuzoval vliv dichromanu draselného na růst sladkovodní řasy *Desmodesmus subspicatus*.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the evaluation of algal test methods and passes judgement on their availability for ecotoxicological analysis of chosen chemical substances. By counting of algal cells and spectrophotometry was determined influence of potassium bichromate on growth of freshwater algae *Desmodesmus subspicatus*.

KLÍČOVÁ SLOVA

řasové testy, ekotoxická, absorbance, počet řas

KEYWORDS

algal tests, ecotoxicity, absorbance, number of algae

ŠTĚPÁNKOVÁ, I. *Posouzení vhodnosti řasových testů pro hodnocení ekotoxicity*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 57 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Helena Doležalová Weissmannová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Mgr. Heleně Doležalové Weissmannové, Ph.D. za cenné rady, věnovaný čas a odbornou pomoc při zpracování mé diplomové práce. Poděkování patří také MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D. za odborné konzultace.

Velké poděkování patří mým rodičům za to, že mi umožnili na této škole studovat a také sestře a příteli za podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Vliv člověka na ekosystém	8
2.2	Hodnocení toxicity a ekotoxicity látek	9
2.3	Testy ekotoxicity	10
2.4	Rozdělení testů ekotoxicity	11
2.4.1	Rozdělení testů dle doby expozice	11
2.4.2	Rozdělení testů dle pokročilosti testovacího systému	12
2.4.2.1	<i>První generace testů</i>	13
2.4.2.2	<i>Druhá generace testů</i>	13
2.4.2.3	<i>Třetí generace testů</i>	13
2.5	Výběr biotestů pro ekotoxikologické testování	14
2.6	Testy na řasách	15
2.7	Základní charakteristika řas	17
2.8	Systematické rozdělení řas	19
2.8.1	Oddělení <i>Chlorophyta</i>	19
2.8.2	Třída <i>Chlorophyceae</i>	20
2.8.2.1	<i>Celková charakteristika</i>	20
2.8.2.2	<i>Významný zástupce</i>	20
2.9	Metodologie testování	20
2.10	Průběh řasového testu	21
2.11	Faktory ovlivňující průběh řasového testu	21
2.11.1	Gradientsy v laboratoři	22
2.11.2	Trvání testu	22
2.11.3	Intenzita světla, teplota a pH	22
2.11.4	Kultivační nádoby	22
2.11.5	Živiny a jejich roztoky	23
2.11.6	Média pro řasové testy	23
2.12	Vyhodnocování testu	25
2.12.1	Stanovení hodnoty E_rC_{50} a E_rC_{10} pomocí růstových rychlostí	26
2.12.2	Stanovení hodnoty E_rC_{50} a E_rC_{10} pomocí integrálů biomasy	27
2.13	Využití testů toxicity v praxi	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
3.1	Přístroje a pomůcky	29
3.1.1	Spektrofotometr HACH DR/4000 U	29
3.1.1.1	<i>Parametry spektrofotometru HACH DR/4000 U pro fotometrická měření</i>	29
3.1.1.2	<i>Stanovení maxima absorbance $K_2Cr_2O_7$</i>	30
3.1.1.3	<i>Stanovení absorpčního maxima řasové kultury</i>	31
3.1.2	Počítací komůrka Cyrus I	31
3.1.3	Binokulární mikroskop L1100B SM 5 A	32
3.1.3.1	<i>Postup stanovení počtu buněk řas</i>	33
3.1.4	Box pro předkultivaci, kultivaci a test	34
3.1.4.1	<i>Příprava předkultivace a inokula</i>	34
3.1.5	Průběh testu a vyhodnocování	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1	Stanovení absorpčního maxima $K_2Cr_2O_7$	37
4.2	Stanovení absorpčního maxima řasové kultury	40

4.3	Stanovení počtu buněk řas v zásobní kultuře.....	40
4.4	Korelace počtu buněk řas pod mikroskopem s fotometrickým měřením koncentrací řasových buněk.....	43
4.5	Předkultivace.....	46
4.6	Řasový test se standardem $K_2Cr_2O_7$	46
4.6.1	Řasový test A s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,75 – 0,9 mg/l.....	46
4.6.2	Řasový test B s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,75 – 0,9 mg/l.....	49
4.6.3	Řasový test s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,4 – 1 mg/l.....	50
4.6.4	Řasový test s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,4 – 2 mg/l.....	51
4.7	Shrnutí výsledků	52
5	ZÁVĚR	53
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	57

1 ÚVOD

V průběhu staletí se do okolního prostředí začaly uvolňovat nejenom látky spojené se zemědělskou činností, avšak s nástupem průmyslové revoluce se do prostředí začaly uvolňovat i látky z průmyslu. Postupem času se ke všem těmto látkách přidávaly látky vzniklé činností člověka a tím také látky uměle vytvořené. Látky antropogenního původu nejvíce zatěžují životní prostředí a jsou předmětem rozsáhlých výzkumů a studií, které se snaží zjistit, jak se látky v prostředí chovají, distribuují, vzájemně ovlivňují, do jaké míry ovlivňují složky životního prostředí a také jakým způsobem je člověk schopen jejich účinek minimalizovat či zcela eliminovat.

Toxické a nebezpečné látky, které se dostanou do vodního ekosystému, jeho systém narušují nejen přímým toxickým účinkem na vodní živočichy a rostliny, ale také nepřímým toxickým účinkem. Ve schopnosti bioakumulace těchto látek v rostlinných a živočišných organismech a jejich následné zabudování do potravního řetězce spočívá další nebezpečí pro biotu a životní prostředí.

Planktonní řasy, které patří mezi primární producenty, hrají ve vodném prostředí nezastupitelnou roli a jsou základním článkem vodního potravního řetězce. Jsou proto základem funkční skupiny organismů, které mají vliv na správné složení a funkčnost celého ekosystému. Kromě toho jsou planktonní řasy citlivé indikátory pro rozdílné účinky látek rozpuštěných ve vodě. Pro jejich citlivost vůči chemickým látkám jsou mezinárodně používány pro testování ekotoxicity nejen pro testování látek, které se dostanou do vody, ale také pro monitoring povrchových, podzemních a odpadních vod.

Předmětem této diplomové práce bylo zhodnocení využitelnosti řasového testu pro testování ekotoxicity nejen na základě teoretických poznatků, ale i praktického provedení řasových testů se standardem dichromanem draselným, následné porovnání shodnosti s normou ČSN EN ISO 8692 a celkové posouzení řasových testů v rámci ekotoxikologického testování v laboratoři č. 4059. Realizace řasového testu rozšíří spektrum prováděných testů v laboratoři ekotoxikologie č. 4059 Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí, FCH VUT v Brně.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vliv člověka na ekosystém

Člověk ovlivňuje dynamickou rovnováhu ekosystémů dvěma způsoby, znečištěním a narušováním.

Ekosystém může být nevyvážený skrze znečišťující látky, např. stabilita je narušena a produktivita a recyklace zhoršena, což znamená, že nadále nejsou udržitelným systémem. Toto vyplývá ze selektivních účinků znečišťujících látek, různým účinkem na různé druhy toxikantů, nebo také v jiném rozsahu a jiných koncentracích. Mohou nastat letální účinky, pokud je organismus vlivem toxické látky usmrčen, ale mnohem častěji jsou účinky subletální, což znamená, že postižený jedinec zůstane naživu, ale např. s narušeným růstem, sníženou schopností reprodukce nebo pozměněným vývojem, přičemž všechny tyto možnosti vedou ke změně ekosystému.

Ne všechny polutanty jsou toxické přímo, nicméně některé z netoxických polutantů mohou být toxické sekundárně. Příkladem je obohacování (eutrofizace) vodního tělesa rostlinnými živinami, jako jsou dusík a fosfor, které mohou do systému vstupovat díky odpadním vodám, umělým hnojivům a některým průmyslovým odvětvím. I při dostatečném příjmu uhlíku a světla je růst rostlin nejvíce ovlivněn těmito živinami. Potom tedy „znečištění“ těmito živinami má spíše hnojící účinek než účinek toxický. Značné obohacování může podnítit nekontrolovatelný růst rostlin, který převyšuje schopnost konzumentů rozkládat tyto rostliny. Rozklad přebytku rostlinné biomasy bakteriemi, které pro svoji činnost spotřebují velké množství kyslíku, může potom převyšovat jeho tvorbu v okolním prostředí. Výsledná deoxygenace vodního prostředí tedy může mít letální účinky na živočichy v ní žijící, kteří potřebují kyslík více než rostliny, které si jej jsou schopny vytvořit samy díky fotosyntéze. Některé z těchto účinků na ekosystém mohou být požitý v biologickém měření znečištění.

Toxikanty mohou narušit udržitelnost přirozeného ekosystému různými účinky na druhy, populace, společenstva a procesy v ekosystému, i když tyto systémy, charakterizované dynamickou stabilitou, mají určitou schopnost absorbovat část těchto znečišťujících látek. Testování toxicity je limitováno v předpovídání takovýchto účinků a chemická měření látek znečišťujících životní prostředí by mělo být prováděno ekologickým monitoringem. [2]

Ekotoxikologie je relativně novým pojmem, který v sobě integruje jak ekologické, tak toxikologické disciplíny. Původně byly testy toxicity, jejich metodické postupy a testovací organismy vybírány na základě neekologických faktorů, protože ekologické byly obecně nevýznamné. První environmentální problémy, které se objevily, byly akutní a viditelné, a zahrnovaly např. hynutí organismů vlivem nedostatku kyslíku, a vedly k aplikaci převážně rybích druhů při testování vody.

Původní problémy byly relativně jednoduché, zahrnovaly polutanty typu organické hmoty, kovů a pesticidů, což se však v průběhu staletí změnilo, znečištění se stalo komplexnějším a nyní zahrnuje směsi chemikálií ve více environmentálních složkách (voda, půda, tkáň, atd.). Efekty znečištění se již netýkají pouze mortality, ale do popředí se dostávají dlouhodobější a obtížněji detekovatelné vlivy jako mutagenita, karcinogenita, vlivy na reprodukci, růst a další. To vede i k mohutnému rozvoji různých metod stanovujících příčiny a efekty znečištění, a ke změně regulačních opatření z nápravy škod způsobených na ekosystému a k prevenci a ochraně zdraví ekosystému. [1]

2.2 Hodnocení toxicity a ekotoxicity látek

Při hodnocení toxicity látek zůstává celá řada nejasností. Důvodem je např. používání několika málo laboratorních testů, jejichž relevance a druhová odpověď na toxicitu nemůže napodobit mnohadruhové odpovědi v přírodních podmínkách, navíc ve vysoce variabilních podmínkách. V testech se obvykle nezkoumají všechna životní stádia, ale zpravidla pouze dospělci. Hodnocení toxicity na ekosystém také zatěžuje důraz na akutní toxicitu, ačkoliv koncentrace jednotlivých toxických látek ve vodách pouze příležitostně dosahuje akutní toxické hladiny. Mezi další problémy při hodnocení toxicity je možné zařadit fakt, že je důraz kladen na akutní toxicitu jednotlivých látek, ačkoliv většina polutantů je normálně vypouštěna jako komplexní směs. Kontaminované vody obvykle obsahují širokou škálu organických i anorganických sloučenin, o jejichž vzájemné interakci se doposud ví velmi málo. Dalším problémem je absence metod pro měření chronické toxicity nebo jejich vlivů v přírodě.

Z hlediska působení toxických látek na ekosystémy je důležitý rozdíl mezi:

- přímou toxicitou, kdy látka působí ve své původní podobě
- nepřímou toxicitou, kdy toxicky nepůsobí látka původní, ale např. meziproducty jejího rozkladu
- kumulativní toxicitou, kdy toxická látka je v organismu postupně kumulována a její účinky se manifestují až po dosažení prahové koncentrace [1]

Toxicitou je představován účinek cizorodých látek na vodní společenstva organismů (rostlin a živočichů). Tyto cizorodé látky se do recipientů dostávají především s nejrůznějšími odpadními vodami. Existuje ale i přirozená toxicita, která vznikla v přírodních vodách bez lidského zásahu působením meziproductů rozkladu těl organismů, např. amoniaku, metanu, oxidu uhličitého a sulfanu. [3]

V průmyslových odpadních vodách se často nacházejí toxické látky, které v „lepší“ případě brzdí životní pochody a v „horší“ případě organismy usmrcují. [4]

Toxicita látek, přípravků a odpadů, popř. odpadních vod, je ovlivněna jejich rozpustností ve vodě, pH, chemickým složením, citlivostí vodních organismů, vlastnostmi samotné látky, způsobem jejího kontaktu s organismem, použitou dávkou, času působení, způsobu absorpce, bioakumulace a v neposlední řadě i charakterem vodního prostředí. [3,5]

Účinek jedu je tedy třeba chápat jako dynamický proces. Látka působí na organismus, který poškozuje a současně působí organismus na látku, kterou obvykle biotransformuje do formy rozpustnější ve vodě. [5]

Pro hodnocení ekotoxikologických vlastností látek jsou používány biologické testy toxicity (biotesty, bioassays, laboratorní zkoušky toxicity). Význam biologických testů spočívá v postižení souhrnu účinků všech přítomných komponent v testovaném roztoku na testovaný materiál (organismus, kultura, tkáň, buňka). Testy toxicity slouží ke zjištění možného toxického vlivu látek na biocenózu vodních toků. Umožňují rychlé a dostatečné zhodnocení odpadů, na jejichž základě lze případně odhadnout negativní účinek těchto látek. Testy podávají i informace o biologické aktivitě a schopnosti toxických látek procházet biomembránami, jsou založené na fyziologických pochodech, biochemických změnách, fotosyntéze a dýchání. Jejich hlavním cílem je stanovit hraniční koncentrace, ve kterých je možný život vybraných testovacích organismů. Testy na organismech vodního prostředí jsou vhodné pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů na skládky, havárii průniku odpadních vod do povrchových či podzemních zdrojů. [6,7]

Informace o ekotoxicitě by měla sloužit jako signál k provedení podrobnějších fyzikálně – chemických analýz nebo alespoň jako doplněk. Indikace toxicity ovšem nemusí korelovat s chemickými a fyzikálními rozbory sledovaného materiálu. Biotesty mohou signalizovat nebezpečí, aniž fyzikálně – chemické analýzy detekují zvýšené hladiny nebezpečných látek ve vzorku, a naopak i přes indikaci toxicity z fyzikálně-chemických rozborů reagují testované organismy negativně. Organismus totiž vypovídá o testovaném materiálu komplexně. Úzce souvisí s biodosažitelností toxických složek nebo se mohou projevit interakce mezi přítomnými polutanty, které z chemických rozborů nevyplývají. [1]

2.3 Testy ekotoxicity

Testy toxicity se provádějí na třech úrovních:

- na úrovni buněk a tkání,
- na úrovni jedinců (organismů),
- na úrovni společenstev (biocenóz). [3]

Testy na úrovni buněk a tkání se používají pro teoretické objasnění poznatků získaných při pokusech na organismech a zaměřují se na biochemické a fyziologické odpovědi organismu k environmentálnímu znečištění. Jejich výhodou je možnost indikace včasného varování, ale chybí jim dlouhodobá ekologická významnost. [1]

Výhodou je jejich dobrá reprodukovatelnost a naopak nevýhodou je značná odlišnost výsledků „in-vitro“ od výsledků obdržných „in-vivo“.

Na úrovni biocenóz se sleduje toxický účinek v přírodě či na modelu, nevýhodou je fakt, že toxický účinek se nemusí projevit vždy stejně, různé reakce na určitý druh, narušení potravních řetězců.

Většina testů se ovšem provádí na úrovni organismů. U těchto testů se můžeme setkat s potížemi spojenými s reprodukovatelností. [7,8]

2.4 Rozdělení testů ekotoxicity

- Dle doby expozice – akutní, semiakutní (semichronické), chronické
- Dle pokročilosti designu testovacího systému:
 - 1. generace – klasické (standardní, konvenční) biotesty
 - 2. generace – mikrobiotesty
 - 3. generace – biosenzory, biosondy, biomarkery [9]
- Dle trofické úrovně testovacích organismů:
 - Producenti – organismy získávají energii absorpcí slunečního záření (rostliny) nebo jednoduchými chemickými reakcemi (bakterie oxidující anorganické sloučeniny)
 - Konzumenti – organismy, které v rámci potravního řetězce získávají energii z organických látek vytvořených producenty, býložravci, masožravci a všežravci
 - Destruenti – organismy rozkládající složité organické látky až na látky anorganické (bakterie, houby, bičíkovci)
- Dle testované matrice – voda, půda, vzduch, sediment, odpad, chemická látka apod.
- Dle spektra testovacích organismů – jednodruhové nebo vícedruhové
- Dle typu testovaného vzorku – čisté chemické látky, směsi látek, přírodní vzorky atd.
- Dle způsobu přípravy vzorků – definované koncentrace chemických vzorků, extrakce přírodních vzorků organickými rozpouštědly, roztoky anorganických solí, při různém pH, vodné výluhy atd.
- Dle způsobu vyhodnocování – např. hodnocení letálních efektů (mortalita, imobilizace), subletálních efektů (chování organismů, např. rychlost a směr pohybu), hodnocení fyziologické aktivity, reprodukční aktivity, mortality, teratogenity apod. [10]

2.4.1 Rozdělení testů dle doby expozice

Při akutní toxicitě je látkou ovlivněn přímo jí vystavený organismus a u chronické toxicity se její projevy zjišťují až na dalších vývojových generacích. [11]

Přechodnou kategorií mezi testy akutní a chronické toxicity jsou testy subchronické toxicity, založené na hodnocení fyziologických projevů a růstu s obdržáním výsledků v krátké době, během 5 – 7 dní. [11,12,13]

Toxikologie vod se zabývá hlavně akutní toxicitou. Chronická toxicita má význam pro pitné vody z hlediska stanovení prahových koncentrací a nejvyšších přípustných koncentrací látek ve vodě.

2.4.2 Rozdělení testů dle pokročilosti testovacího systému

Mezi nejznámější a nejrozšířenější v laboratorní praxi patří standardní laboratorní testy akutní toxicity. Nově se však začínají zavádět alternativní testy toxicity. Ve světě existuje celá řada ekotoxikologických metodik různých mezinárodních organizací. Jako velice perspektivní se jeví snaha rozšířit do co největšího počtu zemí jednotnou metodiku a jednotné hodnocení toxicity látek. V jednotlivých zemích světa byly standardizovány různé metodiky umožňující porovnání výsledků mezi laboratořemi. Mezi nejrozšířenější patří metodiky ISO a metodiky OECD a U. S. EPA. Správnost a shodnost v provádění jednotlivých metodik v laboratořích je zjišťována mezilaboratorním porovnáním a dozorem nad laboratořemi, který provádí sdružení ASLAB a ČIA. [14]

Z důvodu porovnatelnosti výpovědní hodnoty jednotlivých testů a použitých organismů se neprovádí testování látky pouze na jednom typu organismů, ale látka se aplikuje alespoň na tři druhy. Toto paralelní testování se označuje jako základní baterie testů, založené na poznatku o stavbě a propustnosti buněčné stěny u různých organismů, např. destruent, producent a konzument. [6]

Baterie využívá rozdílného charakteru skladby buněčné stěny bakteriálního, rostlinného a živočišného typu buňky. Nejpoužívanější baterie testů akutní toxicity se rozdělují podle účelů použití:

- a) V případě zjišťování ekologického rizika chemických látek a přípravků se používá baterie testů na řasách, perloočkách a rybách.
- b) V případě ekotoxicity a vyluhovatelnosti odpadů se používá baterie testů na řasách, semenech hořčice, perloočkách a rybách.
- c) V případě odpadních vod se baterie doplňují o stanovení okřehku. [3]

V České republice jsou doporučovány 4 konvenční testy metodicky identické s evropskými ISO normami:

- 48 hod akutní test toxicity na rybách (*Poecilia reticulata*, *Brachydanio rerio*)
- 48 hod imobilizační test na perloočkách (*Daphnia magna*)
- 72 hod růstově inhbiční test na řasách (*Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus subspicatus*, *Raphidocelis subspicata*)
- 72 hod test klíčivosti a růstu kořenů hořčice (*Sinapis alba*)

Výhodou těchto biotestů je, že je jejich metodika zakotvena legislativně. Nevýhodou je značná ekonomická náročnost. Kultury testovacích organismů je totiž nutno dlouhodobě udržovat. Samotné testování zabírá mnoho laboratorního prostoru, spotřebovává velké množství testovaného materiálu a vyžaduje též delší pracovní dobu nejen po provedení testu, ale i na mytí laboratorního skla a péči o matečné kultury. Proto se biotesty 2. generace jeví jako výhodná alternativa ke konvenčním testům toxicity. [1]

2.4.2.1 První generace testů

- je představována klasickými, standardními a konvenčními metodikami, které jsou založené na akutních testech v laboratoři chovaných organismech a udržovaných kulturách [15,16]
- příkladem první generace testů mohou být ryby druhu *Poecilia reticulata* (živorodka duhová) a *Brachydanio rerio* (danio pruhovaný), korýši *Daphnia magna* (hrotnatka obecná), chlorokokální řasy druhů *Scenedesmus quadricauda* a *Scenedesmus subspicatus*, semena klíčících kulturních rostlin *Sinapis alba* (hořčice bílá) a *Lactuca sativa* (salát setý) [9]



Obr. 1: Test akutní toxicity na *Sinapis alba* [17]

2.4.2.2 Druhá generace testů

- začíná se v současné době stále více používat
- je představována alternativními biotesty, známé pod názvem mikrobiotesty. Tyto testy využívají klidová stádia testovaných organismů. V případě testů na bezobratlých se používají cysty (perloočky, vířníci) a ehipia (dafnie), u testů na rybách se aplikují tkáňové kultury a jikry, v testech na bakteriích se používají jejich lyofilizované kultury, v řasových testech imobilizované a hluboce zamrazené řasové kultury
- nověji je původní test na klíčících rostlinách nahrazován testem na kalusu, což je tkáňová kultura nediferenciovaných buněk.

2.4.2.3 Třetí generace testů

- je na počáteční úrovni
- využívá biosenzory a biosondy a je založena na fluorescenčním značení toxické látky [8,11]

2.5 Výběr biotestů pro ekotoxikologické testování

Výběr biotestů pro ekotoxikologické testování se liší u různých autorů, firem a laboratoří. Neexistuje žádné obecné pravidlo, podle kterého se jednotlivé testy do posuzovacích sad začleňují. Testy zařazené do posuzovací sady by měly splňovat alespoň některá z následujících kritérií:

- Použité testovací organismy by měly být minimálně tří trofických úrovní (producent, konzument, destruent)
- Pro pevné materiály musí být vedle kontaktních testů použit alespoň jeden test s vodným výluhem testovaného materiálu
- Výběr sady testů musí brát v úvahu i časovou náročnost provedení testů a časovou dosažitelnost výsledků
- Sada testů by měla být sestavena tak, aby postihla větší či menší citlivost testu na přítomný polutant
- Výběr sady testů by měl být proveden i podle toho, k hodnocení jaké kontaminace mají výsledky sloužit [10]

V zásadě však jediným možným způsobem, jak zjistit toxicitu, je tedy test toxicity na živém biologickém materiálu v laboratoři.

Ačkoliv chemické analýzy látek, přípravků, odpadních vod, atmosférických srážek, výluhů a splašků poskytují důležité informace o jejich nebezpečných vlastnostech, nemohou dostatečně poskytnout údaje o toxicitě jednotlivých látek, zejména pokud jde o směsi. Z tohoto důvodu je nutno použít biologické metody hodnocení, tzv. biologické testy toxicity (bioassays). Výhodou biologických testů je schopnost vypovídat o vlivu znečištění v celém jeho komplexu, se všemi aditivními, synergistickými a antagonistickými vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími komponenty. Význam biologických testů hodnocení ekotoxicity je především v tom, že postihují souhrn účinků všech přítomných komponent a současně také látek, které nebyly chemickými analýzami prokázány. [18]

Hlavním cílem testů na biologickém materiálu je stanovení hraničních koncentrací, ve kterých je možný život testovaných organismů. Testy prováděné na vodních organismech jsou vhodné pro hodnocení nově vyvinutých a do praxe zaváděných chemických látek, odpadů na skládky...

Obrovské množství nejrůznějších látek, které mohou potenciálně působit jako škodliviny, není možné monitorovat hydrochemickými metodami, které jsou většinou cílené na určitou látku. Proto biotesty, jako nespecifické, laciné, screeningové testy toxicity či trofie, stále více přitahují zájem. V poslední době roste zájem zapojení biotestů v ekotoxikologických a monitorovacích studiích. [19]

Důvodem je pravděpodobně fakt, že biotesty v sobě integrují informace o toxicitě vzorků a jejich schopnosti procházet membránami. Pomocí biotestů jsme tedy schopni detekovat také toxicitu meziproductů rozkladu původního toxinu. Pro svůj integrální charakter mají biotesty také oproti striktně chemickým analýzám ekonomickou výhodu.

Na výběr testovaného druhu je pro řasové testy brán velký zřetel. Volba druhu je většinou závislá na jeho dostupnosti, požadavcích jednotlivé kultury a případu použití. Většinou je pro danou zkoumanou látku používán jeden druh řas a pro komerční chemikálie je touto řasou téměř pravidelně řasa zelená. [17]

Bioindikátorové organismy jsou vybírány tak, aby to byly typické druhy zastupující nejvýznamnější složky ekosystému. Na působení toxické látky mohou reagovat změnou růstu, pohyblivostí, reprodukce nebo změnou některé fyziologické funkce. Testovací organismus může být toxickou látkou i usmrcen. Toxicita látky může být pro různé organismy odlišná a z tohoto důvodu jsou získané výsledky obtížněji reprodukovatelné. [10]

2.6 Testy na řasách

Testy mají několik modifikací, které se liší hlavně objemy, se kterými se testy provádí. Jako testovací organismus se používají jak mořské (ISO 10253), tak sladkovodní řasy (ČSN EN ISO 8692), test je schválen i U.S. EPA (1978). Jako testovací organismus se používají jednodruhové řasy nebo směs, kde jsou zastoupeny sinice, rozsivky a zelené řasy.

V ČR je standardizována metoda dle normy ČSN EN ISO 8692 z roku 2005, Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas.

Předmětem normy je metoda stanovení toxických účinků chemických sloučenin na růst planktonních sladkovodních řas. Jednodruhové řasové kmeny jsou po několik generací, minimálně však po tři, kultivovány v definovaném médiu, které obsahuje koncentrační řadu zkoušené látky a inokula, a pravidelně je měřena hustota buněk. Inhibice se měří jako snížení růstu nebo růstové rychlosti v poměru ke kontrolní kultuře kultivované za stejných podmínek. Narostlá biomasa je nepřímo úměrná účinku toxických látek a přímo úměrná trofickému potenciálu. Jako parametr je sledován růst zelené řasy a nárůst počtu buněk (tvorba biomasy).

Uvedené metody se v posledních letech významně rozvíjejí a jejich nové modifikace zahrnují použití technik, jako jsou průtoková cytometrie, použití mikrodestiček a imobilizované řasy.

Významnost řasových testů v ekotoxikologii a proces hodnocení rizika s jejich použitím nedosahoval vždy takového významu jako v současné době. Tyto testy nebyly v minulosti považovány za dostatečně hodnotné ve srovnání s testy toxicity na zvířatech. Výzkumem ale bylo zjištěno, že srovnáním toxikologických vyhodnocení se testy fytotoxicity ukázaly jako užitečnější než některé testy toxicity na zvířatech. [20]

Současné vědecké znalosti vztahující se k fytotoxickým testům na chemických látkách jsou primárně založeny na laboratorních výsledcích testování sladkovodních druhů řas. Někdy jsou tyto výsledky testování použity jako náhrada pro další typy jiných testů řas sladkovodních i mořských, cévnaté vodní rostliny a v některých případech i pro rostliny suchozemské. Mimoto jsou laboratorní výsledky pro jednodruhové řasy používány pro předpovídání účinků látek na ekosystém. [21]

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 možné biotest provést s jinými producenty (např. testování půdy)

Rozlišujeme řasové testy trofie a toxicity s mořskými a sladkovodními řasami. Řasové testy trofie a toxicity na mořských řasách postupují dle normy Algal marine bioassay, ISO 10253 a používají rozsivku *Phaeodactylum tricorutum*, testy trofie a toxicity na sladkovodních řasách postupují dle normy ČSN EN ISO 8692, OECD 201.

Některé látky mohou v nízké koncentraci působit neškodně či stimulačně, kdežto ve vysoké koncentraci mohou působit toxicky. Např. těžké kovy působí jako mikroelementy, pokud jsou zředěny v živném roztoku, ale naopak jako jedy, pokud se vyskytují ve vysoké koncentraci.

Testy toxicity, které využívají 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 z důvodu identické výpovědní hodnoty s tzv. konvenčními testy a navíc mají podstatně vyšší produktivitu, která je vhodná pro velkoplošný monitoring.

Řasové testy trofie a toxicity by se měly používat především pro testování látek, které se dostanou do vody, monitoring povrchových, podzemních a odpadních vod a vodních ekosystémů.[22]

V české republice je za standardní test na považován test na sladkovodní řase *Desmodesmus subspicatus* (86.81 SAG), dříve známé pod názvem *Scenedesmus subspicatus* a řase *Pseudokirchneriella subscapitata* (61.81 SAG), dříve známé pod názvem *Selenastrum capricornutum*. [23]

Testy se provádějí pouze ve vodním prostředí a používají se nejen pro hodnocení toxicity odpadů, ale také pro stanovení ekotoxicity chemických sloučenin a chemických přípravků. Jako parametr je sledován růst zelené řasy a nárůst počtu buněk (tvorba biomasy). [10]

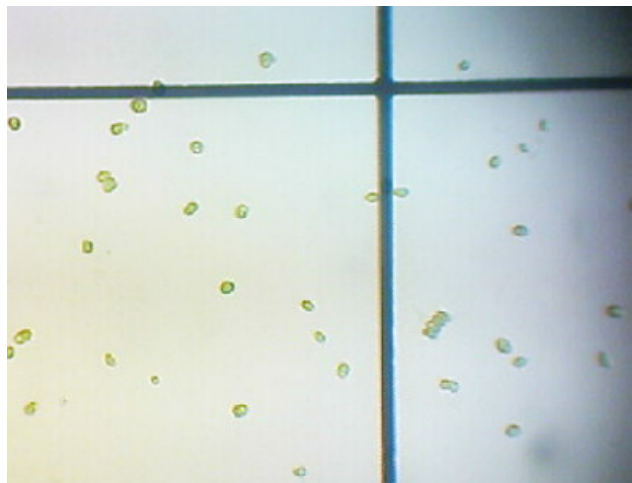
Princip testu spočívá ve stanovení toxického účinku vodou vyluhovatelné látky na inhibici růstu a rozmnožování chlorokokální řasy v jednotlivých koncentracích sledované látky ve srovnání s kontrolami v čistém živném roztoku. Při testu je vhodné zaznamenávat i odchylky od normálního tvaru buněk. [24]



Obr. 2: *Desmodesmus quadricauda*



Obr. 3: *Selenastrum bibraianum*



Obr. 4: *Desmodesmus subspicatus*

2.7 Základní charakteristika řas

Řasy můžeme charakterizovat jako eukaryotické organismy, které uskutečňují fotosyntézu spojenou s uvolňováním molekulového kyslíku, přičemž se tyto procesy dějí v chloroplastech. Některé jsou jednobuněčné, jiné vláknité nebo koloniové. Mnohé mají navenek strukturu podobnou rostlinám, ale s velmi omezenou diferenciací. Jejich rozměry jsou velmi rozdílné, od mikroskopických jednobuněčných řas až po makroskopické hnědé a červené řasy, které dosahují délky až 50 m.

Řasy jsou hlavními producenty organických látek ve vodním prostředí, byť žijí pouze do hloubek, kam proniká světlo použitelné pro fotosyntézu. I když jsou faktory ovlivňující růst řas ve sladkých vodách a v moři podobné, organismy v těchto dvou prostředích jsou zcela odlišné a jeden druh se jen velmi zřídka vyskytuje v obou prostředích.

Ve vodním prostředí jsou dvě základní oblasti výskytu řas – bentos a plankton, přičemž typy řas jsou v nich zcela odlišné.

V bentosu se nacházejí dvě rozdílné životní formy:

- připoutaná a nepohyblivá
- nepřipoutaná, schopná vertikálního a horizontálního pohybu.

Pokud se v mělké vodě, kde je dost světla, ukládají sedimenty, je tam bohatá flóra řas. Základní podmínkou jejich života v tomto prostředí je, že se organismy udržují na povrchu, a to buď tím, že jsou pohyblivé, anebo tvoří vločkovitá seskupení, která sedimentují o mnoho pomaleji než anorganické částice. Tyto řasy často rostou tak hojně, že je jejich nárůst viditelný pouhým okem a nejednou vystupují až k povrchu, nebo je unášejí bublinky kyslíku, který se uvolňuje v průběhu fotosyntézy.

Ve sladkých a slaných vodách se často vyskytují tytéž rody rozsivek, ale druhový výskyt v obou prostředích je odlišný.

Celkový systém akvatických mikroorganismů ovlivňují tři prolínající se základní parametry:

- intenzita světelného záření dopadajícího na povrch sladkovodní a mořské vody
- tepelné vlastnosti vody
- proudění živin ve vodě.

Primární proces fotosyntézy, který uskutečňují řasy, závisí na intenzitě záření. V mořích tato intenzita klesá s narůstající zeměpisnou šířkou. Intenzita fotosyntézy je rozdílná v různých hloubkách, přičemž řasy jsou exponované rozdílným vlnovým délkám pronikajícího světla. Červená složka spektra se absorbuje rychleji než modrá, která proniká do větších hloubek.

Druhý hlavní účinek záření dopadajícího na vodu je jeho ohřivací efekt. Záření ohřívá povrch vody a přestup tepla do hloubky je rozdílný v jednotlivých ročních obdobích. V zimním období řasy cirkulují přes větší hloubky, a tak tráví delší čas v oblasti, kde fotosyntéza není možná. Naproti tomu v létě zůstávají v teplé povrchové vrstvě vody, která dostává i dostatek světla. [25]

Řasy jsou energetický zdroj nezbytný pro většinu vodních ekosystémů. Změny v jejich hustotě a složení mohou ovlivnit chemickou a biologickou kvalitu dané lokality. Proto je hodnocení fytotoxicity znečišťujících látek nezbytnou součástí jakéhokoli vyhodnocení ekologického nebezpečí. Sladkovodní řasy jsou pro testy fytotoxicity používány mnohem častěji než jakékoli jiné typy sladkovodních nebo mořských rostlin, nicméně jsou používány méně často než živočišné druhy. I přesto, že některé rostliny jsou vůči jedovatým látkám méně citlivé než živočichové, bylo výzkumem zjištěno, že řasy byly citlivější než živočichové k různým potenciálním kontaminantům.

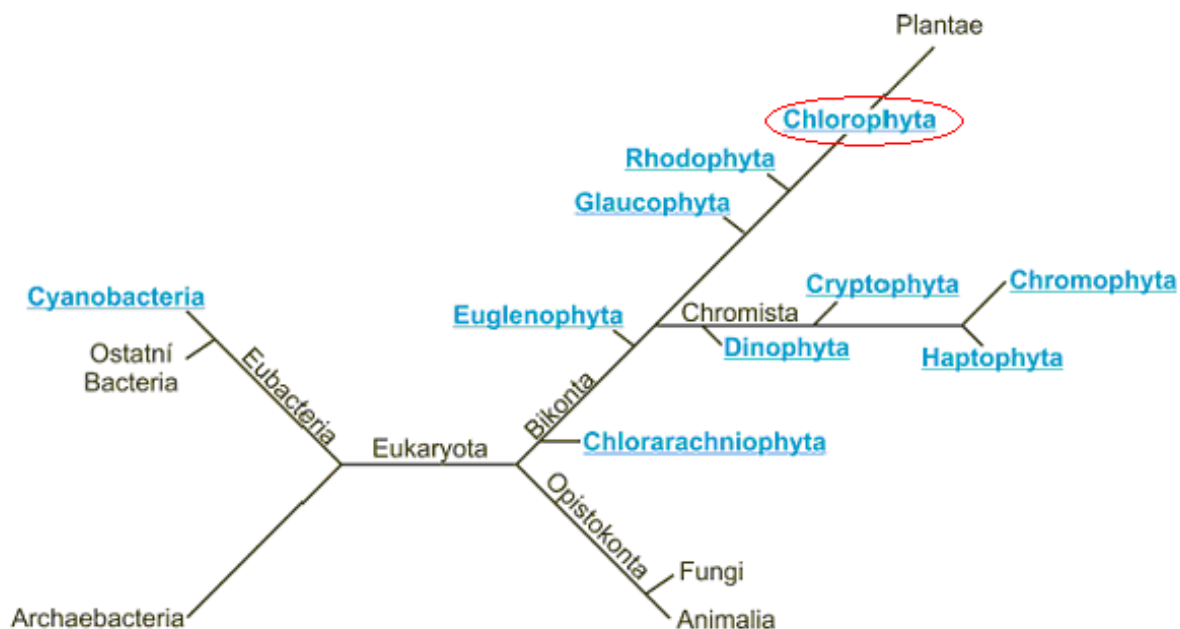
Je zřejmé, že citlivost rostlin a živočichů vůči jedovatým látkám je nepředvídatelná a že nelze předpokládat shodnost těchto testů. Proto je používání řasových testů nezbytné pro odhad ohrožení životního prostředí.

Většina informací, dostupných odborné veřejnosti vztahující se k fytotoxickým účinkům chemických látek a dalších potenciálních jedovatých látek, je založena na výsledcích pro několik řasových druhů, jako je *Selenastrum capricornutum* a několik druhů třídy *Scenedesmus*. Řasa *Selenastrum* byla použita v několika studiích v 70. a 80. letech 20. století. [17]

2.8 Systematické rozdělení řas

Fykologie je obor zabývající studiem řas a sinic. Dle fykologického hlediska lze řasy rozdělit do několika oddělení, jak je názorně zobrazeno na obr. 5.

Řasy používané v normě ČSN EN ISO 8692 patří do oddělení *Chlorophyta*.



Obr.5: Rozdělení řas v rámci fykologie [26]

2.8.1 Oddělení *Chlorophyta*

Základním charakteristickým znakem celé skupiny je výrazné zelené zbarvení, způsobené přítomností asimilačních pigmentů ve skladbě: chlorofyl *a* + *b*, α a β – karoteny a xantofyly. V chloroplastu je přítomen pyrenoid, což je bílkovinné tělísko pokryté škrobovými zrny. Zásobní látkou je α - 1,4 - glukán a polyfosfátové granule volutinu. Povrch buňky je tvořen polysacharidy, hemicelulózou, pektinem a slizem (pokud je vylučován póry, umožňuje pomalý pohyb).

Rozdělení zelených řas do jednotlivých taxonomických tříd je dáno postavením bičíků, průběhem mitózy a charakterem buněčné stěny. [27]

2.8.2 Třída *Chlorophyceae*

Do této třídy se řadí oba druhy používané pro testy ekotoxicity dle normy ČSN EN ISO 8692.

Vzhledem k obrovské šíři třídy *Chlorophyceae* nemají společnou ekologii, snad jen to, že velká většina zástupců jsou sladkovodní typy, ale zahrnuje také značné množství zástupců půdních, aerických a extrémofilních.

2.8.2.1 Celková charakteristika

Řasy se vyskytují jako jednotlivé buňky, kolonie, coenobia nebo trichální až heterotrichální stélky. Vegetativní buňky jsou většinou jednojaderné (výjimku tvoří řád *Protosiphonales*) a haploidní (diploidní fázi je jen zygota).

Bičíkatá stádia jsou nahá (což je de facto jediný znak, který odlišuje skupiny *Chlamydomphyceae* a *Chlorophyceae*).

2.8.2.2 Významný zástupce

Rod *Scenedesmus* je na druhy nejbohatší rod zelených řas s počtem cca 150 druhů, který většinou zahrnuje planktonní druhy. Pro tento rod je typické sdružování se buněk do coenobií po 4, eventuálně po 8 (velmi vzácně po 16).

Z různých pólů buněk mohou trčet do prostoru nejružnější ostny, což zapříčinilo přeřazení do rodu *Desmodesmus*. Buňky mají často i žebrování, což je spolu s postavením buněk hlavním determinacním znakem zařazení do druhu. [28]

Nepohyblivý rod *Scenedesmus* se dá kultivovat i uměle a může se používat na přípravu krmiv nebo potravin. [25]

2.9 Metodologie testování

Akutní řasové testy toxicity jsou prováděny méně často než testy chronické. Některé metodiky řasových testů jsou založeny na populačním růstu [29], jiné používají mikrodestičky [30], imobilizované řasy [31]...atd.

Současně používané sladkovodní řasové testy byly vyvinuty během posledních 20 let několika organizacemi. Tyto testy byly navrženy k provádění testů s rychle rostoucími řasami, které jsou i dobře počítatelné.

Základní provedení všech řasových testů je velmi podobné:

- sleduje účinek toxické látky
- testuje většinou pět koncentrací dané látky
- vyhodnocení provádí v exponenciální fázi růstu
- probíhá ve 3 – 4 denní expoziční době
- expozice probíhá v živinami obohaceném médiu, které je rozpuštěno v nechlorované vodě
- probíhá za kontrolovaných podmínek daných teplotou, pH a intenzitou světla.

Účinky chemické látky se sledují na nárůstu biomasy a rychlosti růstu řasy, které jsou monitorovány denně, ve většině případů elektronickým nebo ručním počítáním buněk. Odpověď rostoucích řas je ve většině případů inhibiční, ale může být i stimulační.

Výsledky testu mohou být ovlivněny několika faktory:

- výběrem druhu řasy
- intenzitou světla
- teplotou trváním testu. [17]

2.10 Průběh řasového testu

Kultura se přeočkovává do živného média v Erlenmayerových baňkách, čímž se připraví zásobní inokulační kultura řas, udržovaná za stejných podmínek jako kmenová kultura. Řasové inokulum pro test se odebírá z exponenciálně rostoucí inokulační kultury. Nejprve se zjistí hustota inokulační kultury v počítači komůrce Cyrus I. a po přípravě ředící řady testované látky se ke každé koncentraci i ke kontrole přidá stejný objem řasové suspenze, jejíž množství se zjistí výpočtem. Kultivační baňky se uzavřou a umístí se do termoluminostatu s osvětlením 6 000 – 10 000 luxů a teplotou 27 ± 2 °C. Test probíhá po dobu minimálně 72 hodin. Od počátku až po konec testu se hodnotí růst řasových buněk v nasazených koncentracích s četností jedenkrát denně. Hustota buněk se zjišťuje pomocí počítači komůrky Cyrus I.

Na konci testu se z naměřených hodnot zjišťuje růstová rychlost μ , z této hodnoty se stanoví inhibice I_{μ} a následně lze z této hodnoty stanovit efektivní koncentraci E_rC_{50} , kde index r značí použití hodnoty růstové rychlosti. [3]

2.11 Faktory ovlivňující průběh řasového testu

Výsledky testu se považují za platné, jestliže jsou splněna následující kritéria:

- 1) hustota buněk u kontrolního vzorku se musí v průběhu 72 hodin zvýšit více než 16krát
- 2) pH v kontrolním vzorku se nemá změnit během testu o více než 1,5 jednotky
- 3) zjištěná hodnota 72 hod E_rC_{50} dichromanu draselného je ve shodě s výsledky odpovídajícími pro tento standard. [32]

Na průběh řasového testu má vliv několik faktorů. Do nich se zahrnují faktory nejen dříve popsané, jako koncentrace zkoumané látky, výběr organismu a další, ale také faktory následující. [33]

2.11.1 Gradienty v laboratoři

Řasy mění svoji morfologii v závislosti na vnějších podmínkách. Pro podrobnější biochemické, fyziologické a strukturní analýzy je nutné pěstovat řasy v přesně definovaných podmínkách, přičemž samozřejmě nelze sledovat všechny podmínky. A pokud se zaměříme na sledování určité podmínky, nemusí to být právě ta nejdůležitější. U řas se nejčastěji sleduje vliv teploty, ozáření a koncentrace živin. [34]

2.11.2 Trvání testu

Na délku trvání testu je brán velký zřetel, neboť může velmi ovlivnit výsledek testování. Většina řasových testů trvá 3 – 4 dny. Kratší doba testování byla doporučena pouze pro případy, kdy se zkoumaná chemická látka může sorbovat na stěny nádoby, čímž se koncentrace chemické látky snižuje, a biomasa řasy může rapidně růst, a také mohou nastat změny pH ve zkoušené vodě. Oproti tomu se testy trvající delší dobu, tedy 5 – 21 dní, používají např. pro sledování stimulačního efektu. [35]

V poslední době je snaha o rozvinutí a validování kratšího testu, který by poskytl relativně rychlé výsledky fytotoxicity. Příkladem tohoto testu může být test na mikrodestičkách. [36]

2.11.3 Intenzita světla, teplota a pH

Intenzita světla, teplota a pH mohou ovlivnit výsledky testu fytotoxicity. Toto tvrzení lze očekávat už z důvodu, že všechny tyto veličiny ovlivňují toxicitu chemických látek pro vodní živočichy. S rostoucí intenzitou světla a teploty zpravidla roste i toxicita. [37]

Vliv pH je méně předvídatelný, neboť toxicita může klesnout s rostoucím pH [38] nebo může dosáhnout největší hodnoty na některé ze středních hodnot pH. [39] Problematika pH je rozvedena v kapitole 2.11.5.

2.11.4 Kultivační nádoby

Standardní test doporučuje E - lahve o objemu 250 ml. Tato technika kultivace u ČSN EN 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 řas či optické hustoty i sušiny jsou třeba řádově jen ml suspenze.

Nabízí se tedy 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 není cena CO₂ podstatná. [22]

2.11.5 Živiny a jejich roztoky

Pro testování organismů jsou předepsána testovací média, ve kterých je podstatná koncentrace dusíku a fosforu, mikroprvků, EDTA a forma dodání uhlíku.

Zdrojem C je v normě ČSN EN ISO 8692 přídavek NaHCO₃. Tento způsob zásobení C je však slabým místem této normy a přivedl ji do „pH pastí“.

V samotném znění normy jsou totiž rozpory. Na straně 10 se požaduje přídavek hydrouhličitanu a úprava pH zásobního roztoku živin na $8,1 \pm 0,2$. Tato úprava pH je ale zbytečná. Zásobní roztok se ředí 8x, obohacuje různými koncentracemi testované látky či výluhu a nakonec inokulem. pH by se tedy mělo měřit, popřípadě upravovat až na začátku samotného testu, v kultuře. Na téže straně se současně uvádí: „Obvykle se zkouška provádí bez úpravy hodnoty pH...“

Zvýšení hodnoty pH na $8,1 \pm 0,2$ 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 $8,1 \pm 0,2$, pak je provzdušňování zbytečné, naopak se jím sníží pH a hydrouhličitan nemůže být využit.

Řasy jsou většinou schopny využívat jako zdroj C nejen CO₂, ale i hydrouhličitan, výsledkem i podmínkou je ale i alkalizace média. Zvýšení pH o více než 1,5 však norma považuje za důvod neplatnosti testu.

Důvody pro eliminaci změn pH jsou správné, neboť pH může měnit toxicitu těžkých kovů a to ji nejen snižovat, ale i zvyšovat. [22]

2.11.6 Média pro řasové testy

Důležitou složkou řasových kultur a řasových testů je živné médium. Koncentrace mikro- a makronutrientů přesahuje jejich koncentraci v přírodních vodách a tudíž ovlivňuje platnost výsledků pro environmentální použití. Řasová kultura v živném médiu rychle roste a její populace se může během 24 hod zdvojnásobit až ztrojnásobit. Mimo média popsána a publikovaná v metodikách testů bylo publikováno množství dalších vyhovujících živných médií [40,41]. Výsledky jednotlivých testů se tedy mohou lišit v závislosti na použitém živném médiu. [42]

Většímu prostoru při zkoumání složení živného média byla věnována pozornost dusíku, fosforu a EDTA. [43]

Jsou známa různá živná média pro testování zelených řas. Některé příklady jsou uvedeny dále, ovšem pro testy prováděné v rámci této diplomové práce bylo použito živné médium dodané z Botanického ústavu AV v Třeboni.

Pracovní roztok pro testy na zelené řase dle normy ČSN EN ISO 8692

Médium se připravuje ze 4 zásobních roztoků, které se liší dle složek. V Tab. 1 je uvedeno složení živného média dle normy ČSN EN ISO 8692.

Tab. 1: Hmotnostní koncentrace živin v médiu [23]

Zásobní roztok	Živina	Hmotnostní koncentrace v zásobním roztoku
Zásobní roztok 1: makrosložky živin	NH ₄ Cl	1,5 g/l
	MgCl ₂ .6H ₂ O	1,2 g/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,8 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,5 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l
Zásobní roztok 2: Fe – EDTA	FeCl ₃ .6H ₂ O	64 mg/l
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100 mg/l
Zásobní roztok 3: stopové prvky	H ₃ BO ₃ ^a	185 mg/l
	MnCl ₂ .4H ₂ O	415 mg/l
	ZnCl ₂	3 mg/l
	CoCl ₂ .6H ₂ O	1,5 mg/l
	CuCl ₂ .2H ₂ O	0,01 mg/l
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7 mg/l
Zásobní roztok 4: NaHCO₃	NaHCO ₃	50 g/l
^a H ₃ BO ₃ může být rozpuštěna přidáním 0,1 mol/l NaOH		

Pracovní roztok pro testy na zelené řase dle Knoppa

Na VŠCHT se používá pro testy na zelených řasách pracovní roztok dle Knoppa, který se získá přípravou čtyř zásobních roztoků solí a příslušným ředěním vodou.

Tab. 2: Pracovní roztok pro testy na řasách dle Knoppa [3]

Zásobní roztok	Chemikálie	Navážka/Objem vody	Použitý objem zásobního roztoku na 1 000 ml ředící vody	
č.1	KNO ₃	10 g / 1 000 ml	10 ml	vše postupně nadávkovat a objem doplnit do 1 000 ml
č.2	K ₂ HPO ₄	1 g / 1 000 ml	10 ml	
č.3	MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g / 1 000 ml	10 ml	
č.4	FeCl ₃	0,1 g / 1 000 ml	1 ml	

Pracovní roztok pro testy na zelené řase, CCALA Bristol BB médium

Médium připravuje a dodává CCALA, Botanický ústav AV v Třeboni. Používá ho pro testování látek na řasách a bylo použito i pro testování v této diplomové práci.

Tab. 3: Složení živného média Bristol BB

Médium BB (Bristol modif. Bold), BOLD (1949): pro většinu řasových kultur					
Roztok „a“ (1000 ml)		Roztok „b“ (100 ml)		Roztok „e“ (100 ml)	
NaNO ₃	25 g	Chelaton III	5,0 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,882 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g	KOH	3,1 g	MgCl ₂ .4H ₂ O	0,144 g
K ₂ HPO ₄	7,5 g	Roztok „c“ (100 ml)		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,242 g
KH ₂ PO ₄	17,5 g	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498 g	or MoO ₃	0,071 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g	H ₂ SO ₄ conc.	0,1 ml	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,157 g
NaCl	2,5 g	Roztok „d“ (100 ml)		Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049 g
		H ₃ BO ₃	1,142 g		

2.12 Vyhodnocování testu

V řasových testech byly zaznamenány rozdílné účinky toxicity, včetně fyziologických a morfologických změn. Nicméně ve většině případů se jednalo o inhibiční a v menším rozsahu stimulační efekt toxikantu na biomasu. Stimulace růstu se ovšem, i přes svůj občasný výskyt, ve fytotoxických testech většinou neuvádí. [17]

Výsledky testů lze vyjadřovat pomocí metod přímých i nepřímých:

Metody přímé:

- kvantifikace počtu řas (mikroskopicky, flow cytometricky)
- gravimetricky
- objemovou biomasou (centrifugací v kalibrovaných zkumavkách)

Metody nepřímé:

- stanovení spalného tepla na mikrokolorimetru
- CHN analýza
- kvantifikace chlorofylu
- spektrofotometricky nebo pomocí fluorescence chlorofylu
- stanovení rychlosti příjmu klíčových živin, atd.

Každá metoda vyhodnocování testů má své výhody i nevýhody a tedy i různé uplatnění pro různé typy vzorků, např. pro počítání řas pod mikroskopem v potřebných intervalech se měří přírůstky biomasy řas. Nejčastěji se počítají buňky pod mikroskopem nebo se měří jejich absorbance na spektrofotometru při 680 nm. [22]

Výsledky testování jsou většinou uváděny jako aktuální počet jedinců, změna růstové rychlosti nebo plocha pod růstovou křivkou, z nichž se počítají hodnoty E_rC_{50} a E_rC_{10} .

Růst je často vybrán jako odpovídající odezva k měření subletálních efektů. Je nejenom jednoduché ho kvantifikovat, ale spojuje také soubor biochemických a fyziologických efektů v jednu hodnotu. [44]

Grafická interpolace je jednoduchou a užitečnou metodou k určení hodnot E_rC_{50} a E_rC_{10} [45] a 95% interval spolehlivosti může poskytnout použití lineární a nelineární metoda regrese. [17]

Výsledky testů se tedy vyhodnocují graficky nebo využitím počítačové techniky. Hodnota E_rC_{50} a E_rC_{10} se vypočítává pro každý z paralelních testů zvlášť a výsledná hodnota je průměrem těchto hodnot.

Hodnoty E_rC_{50} a E_rC_{10} se vyhodnocují dvěma základními způsoby:

- 1) stanovením hodnot E_rC_{50} a E_rC_{10} pomocí růstových rychlostí
- 2) stanovením hodnot E_rC_{50} a E_rC_{10} pomocí integrálů biomasy

2.12.1 Stanovení hodnoty E_rC_{50} a E_rC_{10} pomocí růstových rychlostí

Tento princip je založen na porovnání růstových rychlostí μ řasové kultury v testovaných roztocích a v kontrole:

Nejprve se vypočítá růstová rychlost μ dle rovnice:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0} \quad (1)$$

kde: μ – specifická růstová rychlost,
 t_0 – doba začátku zkoušky,
 t_L – doba ukončení zkoušky,
 x_0 – jmenovitá počáteční hustota buněk,
 x_L – hustota buněk měřená v době t_L .

Z vypočtených hodnot μ pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek se vypočítá inhibice v procentech pro každou testovanou koncentraci z následující rovnice:

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (2)$$

kde: $I_{\mu i}$ – inhibice v procentech pro zkoušenou koncentraci i ,
 μ_i – střední růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci i ,
 μ_c – střední růstová rychlost u kontrolního vzorku. [23]

2.12.2 Stanovení hodnoty E_rC_{50} a E_rC_{10} pomocí integrálů biomasy

Základem pro výpočet hodnoty EC_{50} jsou růstové křivky řasové kultury sestavené pro jednotlivé koncentrace, které se porovnávají s kontrolou. Stanovení inhibice růstu je založeno na porovnání ploch pod růstovými křivkami řasové kultury v kontrole a v testovaných vzorcích (integrály biomasy).

Plocha pod růstovou křivkou se vypočítá pro každou testovanou kulturu z rovnice:

$$A = \frac{(N_1 - N_0) \cdot t_1}{2} + \frac{(N_1 + N_2 - 2N_0) \cdot (t_2 - t_1)}{2} + \dots + \frac{(N_{n-1} + N_n - 2N_0) \cdot (t_n - t_{n-1})}{2} \quad (3)$$

kde: t_1 – je doba prvního měření od počátku testu,
 t_n – je doba n – tého měření od počátku testu,
 N_0 – jmenovitá počáteční hustota buněk,
 N_1 – změřená hustota buněk v čase t_1 ,
 N_n – změřená hustota buněk v čase t_n .

Z vypočtených hodnot A pro každou testovanou koncentraci a kontrolní vzorek se vypočítá inhibice růstu I_{Ai} v procentech pro každou testovanou koncentraci z rovnice:

$$I_{Ai} = \frac{(A_c - A_i) \cdot 100}{A_c} \quad (4)$$

kde: I_{Ai} – inhibice pro danou koncentraci zjištěná na základě porovnání ploch pod růstovými křivkami,
 A_i – průměrná plocha pro danou koncentraci,
 A_c – průměrná plocha pro kontrolní vzorek. [32]

2.13 Využití testů toxicity v praxi

Testy toxicity se s úspěchem používají ve vodárenství a to zejména při havarijních situacích. Chronické testy jsou vhodné pro sledování a kontrolu dlouhodobě působících nízkých koncentrací škodlivin z bodových i plošných zdrojů. Testů toxicity lze použít pro sledování jakosti vody ve vodárenských tocích, kde je vhodná aplikace ryb pro včasnou signalizaci havarijních změn kvality surové vody přitékající na úpravnu. Testování na řasách se používá zejména pro vodu ve studních a rozvodných systémech.

Dalším odvětvím, kde se testy toxicity používají je čistírenství vod, kde se testy využívají především pro zjištění toxicity surových odpadních vod a v případě havárií na tocích po úniku nečištěných splaškových nebo průmyslových vod.

V papírenském či energetickém průmyslu s aplikací biocidů či inhibitorů koroze je vhodné provedení testů toxicity akutní i chronické a v případě testů toxicity na řasách se zaznamenané odchylky od původního tvaru buňky používají jako další hodnotící kritérium. [3]

Hodnocení ekotoxicity je součástí požadavků ve vyhlášce 376/2001 Sb. o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů, ve znění pozdějších předpisů, a také v základní chemické legislativě v současnosti stále platné, tedy zákon 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích, ve znění pozdějších předpisů.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a pomůcky

Pro praktické zpracování diplomové práce byly použity dále popsané přístroje a pomůcky.

3.1.1 Spektrofotometr HACH DR/4000 U

Pro stanovení koncentrační řady $K_2Cr_2O_7$ a následnou korelaci mezi počítáním jednotlivých buněk řas na mikroskopu a jejich absorbancí na spektrofotometru.



Obr. 6: Spektrofotometr HACH DR/4000 U

Na spektrofotometru HACH DR/4000 U je přednastaveno několik programů pro stanovení různých chemických látek, jako je brom, chlor, chrom, olovo...atd., ale i pro stanovení rozpuštěného kyslíku, ozonu, turbiditu...atd.

Mimo těchto přednastavených programů je možné si vytvořit vlastní program pro určitou látku a nastavit si parametry měření.

3.1.1.1 Parametry spektrofotometru HACH DR/4000 U pro fotometrická měření

V hlavní nabídce přístroje se zvolila možnost vytvořit User program.

Byly tedy vytvořeny dvě uživatelské metody pro $K_2Cr_2O_7$ s okyselením H_2SO_4 :

- Uživatelská metoda 21, ve které byla proměřena koncentrační řada v širokém rozpětí koncentrací $K_2Cr_2O_7$ od 0 do 200 mg/l

Tab. 4: Tabulka nastavení parametrů metody 21

Metoda 21	
Name:	Cr_Iva
Format:	XX.XXX
Units:	mg/l
Chemical form:	6 ⁺
Lower limit:	0,000 mg/l
Upper limit:	200 mg/l
Wavelength:	355 nm

- Poté byla vytvořena další metoda 24 s menším rozpětím koncentrací $K_2Cr_2O_7$ od 0 do 40 mg/l

Tab. 5: Tabulka nastavení parametrů metody 24

Metoda 24	
Name:	Cr-Iva-M
Format:	XX.XXX
Units:	mg/l
Chemical form:	6 ⁺
Lower limit:	0,000 mg/l
Upper limit:	40,000 mg/l
Wavelength:	355 nm

3.1.1.2 Stanovení maxima absorbance $K_2Cr_2O_7$

Pro stanovení maxima absorbance byl připraven roztok $K_2Cr_2O_7$ o koncentraci 1 g/l s destilovanou vodou do odměrné baňky o objemu 25 ml. Na spektrofotometru se zvolila možnost SCAN a zadalo se rozpětí vlnových délek 200 – 400 nm, ve kterém mělo být spektrum proměřeno. Nejprve se proměřila destilovaná voda, která sloužila jako base-line, a poté se proměřil roztok $K_2Cr_2O_7$.

Vzhledem k jeho špatně zřetelným píkům se měření muselo zopakovat. Zkusilo se tedy jednotlivě okyselení 1 ml koncentrované H_2SO_4 a poté 5 ml ředěné HCl 1:10. Z lepšího grafu byla odečtena maximální absorbance $K_2Cr_2O_7$.

3.1.1.3 Stanovení absorpčního maxima řasové kultury

Připravil se roztok o objemu 10 ml, ve kterém byl 1 ml zásobní kultury řas společně s 9 ml destilované vody. Tento roztok byl proměřen funkcí SCAN proti destilované vodě v rozmezí 300 – 700 nm a absorpční maximum řas bylo zjištěno při vlnové délce 683 nm.

Dále se připravily tři roztoky řasové suspenze pro ověření absorpčního maxima a pro zjištění stability suspenze v čase z důvodu možného usazování řasové kultury v baňkách.

Za tímto účelem byla vytvořena koncentrační řada metodou ředění zásobní kultury:

- 1) Po důkladném promíchání zásobní kultury se odebralo 10 ml zásobní kultury řas a toto množství se naředilo 40 ml destilované vody na celkový objem 50 ml
- 2) Poté se odebralo 20 ml z roztoku 1 a naředilo se 30 ml destilované vody opět na celkový objem 50 ml
- 3) Nakonec se odebralo 20 ml z roztoku 2 a toto množství se opět naředilo 30 ml destilované vody

Vlnová délka 683 nm se ve všech případech potvrdila a sloužila pro nastavení parametru vlnové délky v programu 25 s názvem Iva-Algae, ve kterém se neudávaly žádné koncentrace ani procenta, ale pouze se proměřily absorbance 3 roztoků, které vytvořily koncentrační řadu. Roztoky se nechaly 1 hod 30 min odstát, a poté byly bez protřepání opět proměřeny programem 25. Bylo zjištěno, že v tomto časovém intervalu docházelo ke změně absorbancí, což potvrdilo předpoklad usazování řasové suspenze.

3.1.2 Počítací komůrka Cyrus I

Počítací komůrka Cyrus I sloužila pro počítání jednotlivých buněk řas pod mikroskopem L1100B SM5A.



Obr. 7 : Počítací komůrka Cyrus I

Tab. 6: Parametry počítací komůrky

Cyrus I	
Objem:	0,01 ml
Plocha:	100 mm ²
Hloubka:	0,10 mm
Počet čtverců:	1600

Během každého počítání se spočítalo 15 – 20 řad po 40 čtvercích. Při počítání bylo zjištěno, že při okrajích krycího sklíčka dochází k nerovnoměrnému rozložení řas. Z tohoto důvodu se počítalo vždy ve středu komůrky a ne při okrajích.

3.1.3 Binokulární mikroskop L1100B SM 5 A

Pro stanovení počtu řasových buněk v zásobní kultuře a korelaci mezi počtem řasových buněk v různých koncentracích a jejich absorbancí na spektrofotometru.



Obr. 8: Binokulární mikroskop L1100B SM 5 A

3.1.3.1 Postup stanovení počtu buněk řas

Pro počítání se připravovaly různě koncentrované roztoky buněk řas, které byly ředěny destilovanou vodou. Z nich se po důkladném protřepání odebralo vždy 10 µl mikropipetou, odebraný objem se nanesl na Cyrusovu komůrku, překryl krycím sklíčkem a komůrka se upevnila do mikroskopu. Po spočítání se omyla komůrka i sklíčko ethanolem, nechala se oschnout a nanesl se další roztok. Každá koncentrace se spočítala 3 – 5 krát. Pokud se čísla relativně shodovala, spočítala se třikrát, jinak se počítala pětkrát.

Počty řas v jednotlivých řadách byly zaznamenávány a z jejich součtu byl vypočítán počet buněk řas v 1 ml (X) dle normy ČSN 75 7712: [46]

$$X = \frac{a.K}{n.z.V} \quad (5),$$

kde: X – počet buněk řas v 1 ml,
 a – počet jedinců nebo buněk v n čtvercích,
 n – počet vyšetřených čtverců,
 z – zahuštění vzorku,
 K – celkový počet čtverců v komůrce (Cyrus I: $K = 1600$),
 V – objem komůrky (Cyrus II: $V = 0,01$ ml).

Se střední hodnotou vypočítaných čísel se dále počítalo při ředění roztoků pro korelaci.

Pro stanovení korelace počtu řasových buněk k fotometrickým údajům byla určena typová řada koncentrací řas v 1 ml: 0, 1.10^3 , 5.10^3 , 1.10^4 , 5.10^4 , 1.10^5 , 5.10^5 , $6,6.10^5$, $1,1.10^6$, $1,76.10^6$ a $2,2.10^6$.

Z již známé koncentrace počtu buněk řas v zásobním roztoku se napočítal objem tohoto roztoku, který se napipetoval do předem určeného objemu 10 ml a doplnil destilovanou vodou. Následně byl ještě teoretický počet buněk řas ve výsledném roztoku přepočítán na procenta k základní zásobní kultuře.

Nejprve se pouze pro kontrolu proměřil funkcí SCAN na spektrofotometru jeden z roztoků, z důvodu ověření maximální absorbance. Po ověření byla nastavena další metoda 27, ve které se proměřily roztoky a byla vytvořena koncentrační řada závislosti absorbance na koncentraci buněk řas.

Z každého roztoku se odebralo 10 µl a spočítal se počet řas. Tento postup se u každé koncentrace opakoval třikrát.

Tab. 7: Tabulka nastavení parametrů metody 27

Metoda 27	
Name:	Iva-rasy-d2
Format:	XX.XXX
Units:	%
Chemical form:	OFF
Lower limit:	OFF
Upper limit:	OFF
Wavelength:	683 nm

Tentýž postup se na spektrofotometru zopakoval s živným médiem místo destilované vody. Byly proměřeny koncentrace 0 , $1 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$, $5 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^5$, $6,6 \cdot 10^5$ a $1,1 \cdot 10^6$. Koncentrace $1,1 \cdot 10^6$ se tentokrát počítala za 100%. Na spektrofotometru byla pro toto měření nastavena metoda 29 s názvem Iva-rasy-m2, která měla stejné nastavení parametrů jako metoda 27, pouze jako base-line sloužilo živné médium.

Absorbance této koncentrační řady byla proměřena po dvou dnech pro zjištění růstu řas.

Tab. 8: Tabulka složení živného média dodaného z Botanického ústavu AV v Třeboni

Médium BB (Bristol modif. Bold), BOLD (1949): pro většinu řasových kultur					
Roztok „a“ (1000 ml)		Roztok „b“ (100 ml)		Roztok „e“ (100 ml)	
NaNO ₃	25 g	Chelaton III	5,0 g	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,882 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g	KOH	3,1 g	MgCl ₂ .4H ₂ O	0,144 g
K ₂ HPO ₄	7,5 g	Roztok „c“ (100 ml)		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,242 g
KH ₂ PO ₄	17,5 g	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498 g	or MoO ₃	0,071 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g	H ₂ SO ₄ conc.	0,1 ml	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,157 g
NaCl	2,5 g	Roztok „d“ (100 ml)		Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049 g
		H ₃ BO ₃	1,142 g		

3.1.4 Box pro předkultivaci, kultivaci a test

Box, který sloužil pro předkultivaci, kultivaci a samotný řasový test byl realizován skleněným uzavíratelným akváriem, které bylo dostatečně zásobováno vzduchem pomocí akvaristického motorku, čímž byla současně zajištěna izolace i provzdušňování.

Baňky s řasami bylo nutné umístit do místa, ve kterém byla intenzita osvětlení 6 000 – 10 000 lux. Intenzita byla proměřena a kontrolována luxmetrem TECPEL 536 a v místě největšího osvětlení byla intenzita 6 473 lux. Osvětlení zajišťovala lampa GLO T5 HO A – 3900 se zářivkou AQUA MEDIC, aqualine T5 s výkonem 24 W a v místnosti byla udržována konstantní teplota 21 °C.

3.1.4.1 Příprava předkultivace a inokula

Nejprve se připravil živný roztok, ve kterém předkultivace probíhala. K 50 ml živného média se přidalo 400 ml destilované vody a celý objem se řádně promíchal. Z tohoto roztoku se odebralo 100 ml, do kterých se přidala zásobní kultura řas tak, aby výsledná koncentrace řasové suspenze nepřesahovala 10 000 buněk řas/ml. Byla tedy zvolena koncentrace $7 \cdot 10^3$ řas/ml a ze známého počtu buněk řas v zásobní kultuře se spočítal objem 306 μ l. Z důvodu dobrého odebrání tohoto objemu se mikropipetou odebralo 315 μ l, což odpovídalo koncentraci $7,21 \cdot 10^3$ řas/ml.

Tímto způsobem se připravily dva totožné roztoky, oba byly důkladně protřepány, proměřeny na spektrofotometru metodou 27 a jejich absorbance byla zaznamenána. Poté byly přelity do širokohlých Erlenmayerových baněk, které se překryly zátkou z gázy. Oba roztoky byly umístěny do uzavřeného boxu osvětleného zářivkou, přičemž jeden roztok byl provzdušňován hadičkou a druhý pouze z prostoru provzdušňovaného boxu. Předkultivace trvala 2 – 4 dny a byla připravena pro každý test samostatně.

3.1.5 Průběh testu a vyhodnocování

Po 2 – 4 dnech předkultivace se připravil samotný test. Jelikož se v normě ČSN EN ISO 8692 udává jako $E_{rC_{50}} K_2Cr_2O_7$ hodnota 0,84 mg/l, byla zvolena koncentrační řada 0, 0,4, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 1,0 a 2,0 mg/l, která se rozdělila na několik samostatných testů.

Před začátkem přípravy řasového testu se na spektrofotometru proměřila absorbance předkultivace a zjistilo se, zda od začátku testu narostla. Ze zjištěné absorbance se spočítala hustota buněk řas v roztoku a z ní potom potřebný objem do 25 ml, aby splňoval podmínku méně než 10 000 řas/ml.

Do každé baňky se nalila trocha roztoku připraveného již pro předkultivaci, kterým se poté doplňoval zbytek objemu baňky po rysku, napipetoval se vypočítaný objem $K_2Cr_2O_7$ a inokula a důkladně se promíchal.

Pro každou koncentraci se připravil pouze jeden replikát kvůli nedostatku místa. Každý roztok byl proměřen na spektrofotometru a jeho absorbance byla zaznamenána jako nulová hodnota na počátku testu. Poté se všechny roztoky promíchaly, přelily do širokohlých Erlenmayerových baněk o objemu 50 ml, překryly parafilmem a umístily do osvětleného boxu.

Každých 24 hodin se všechny roztoky důkladně promíchaly, změřily se jejich absorbance a zaznamenaly se. Po 72 hodinách od nasazení se test ukončil a byl vyhodnocen v programu Microsoft Office Excel pomocí vzorců dle normy ČSN EN ISO 8692:

Specifická růstová rychlost:

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0} \quad (1)$$

kde: μ – specifická růstová rychlost,
 t_0 – doba začátku zkoušky,
 t_L – doba ukončení zkoušky,
 x_0 – jmenovitá počáteční hustota buněk,
 x_L – hustota buněk měřená v době t_L .

Inhibice v procentech (růstová rychlost):

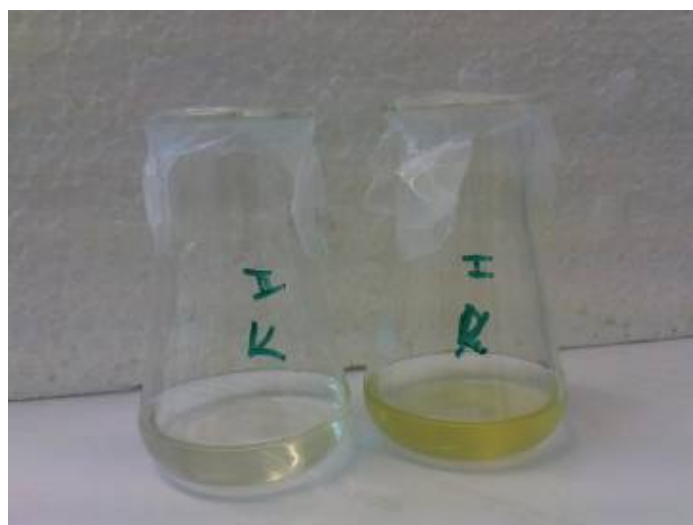
$$I_{\mu_i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100 \quad (2)$$

kde: I_{μ_i} – inhibice v procentech pro zkoušenou koncentraci i ,
 μ_i – střední růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci i ,
 μ_c – střední růstová rychlost u kontrolního vzorku.



Obr. 9: Řasový test

Jednoduchým experimentem pro světelné podmínky byl potvrzen vliv světla na růst řasové kultury, jak je patrné z obrázku 5. Kultura, která byla vystavena osvětlení dle normy se vyznačovala růstem (viz nazelenalé zbarvení). Kultura, která nebyla vystavena dostatečným světelným podmínkám, téměř nerostla, což se projevilo nezměněním zbarvení řasové suspenze (viz téměř čirý roztok).



Obr. 10: Důsledek různé intenzity osvětlení

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

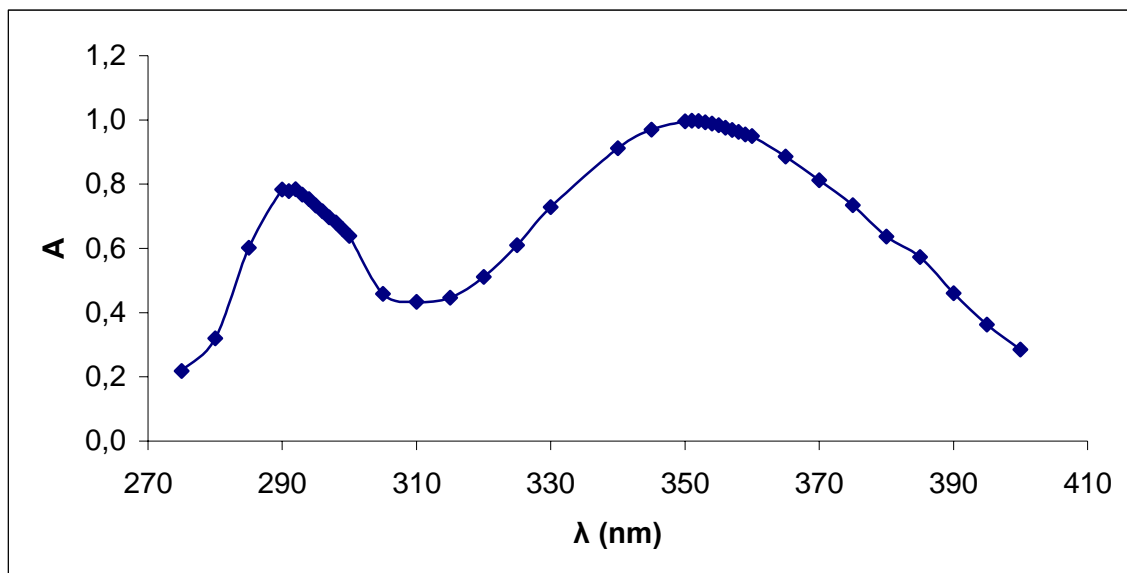
4.1 Stanovení absorpčního maxima $K_2Cr_2O_7$

Absorpční spektrum $K_2Cr_2O_7$ má mít dle [47] dvě absorpční maxima, přičemž první s nižší vlnovou délkou má mít vyšší absorbanci.

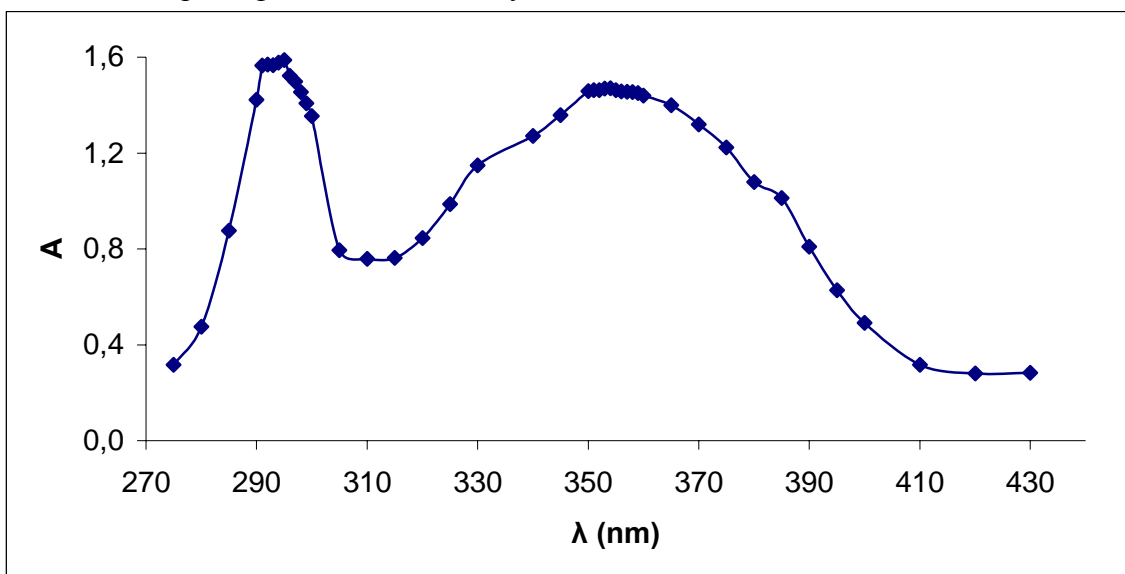
První roztok, připravený pouze zředěním zásobního roztoku $K_2Cr_2O_7$ destilovanou vodou, měl vyšší druhé maximum. Byly tedy proměřeny okyselené roztoky ředěnou HCl a koncentrovanou H_2SO_4 , z nichž v magazínu uvedeným hodnotám lépe odpovídal roztok s přídáním H_2SO_4 .

V následujících grafech jsou znázorněna absorpční maxima jednotlivých roztoků. Jediný roztok s H_2SO_4 měl první absorpční maximum vyšší než druhé a zároveň se hodnota maxima téměř shodovala s udanou hodnotou.

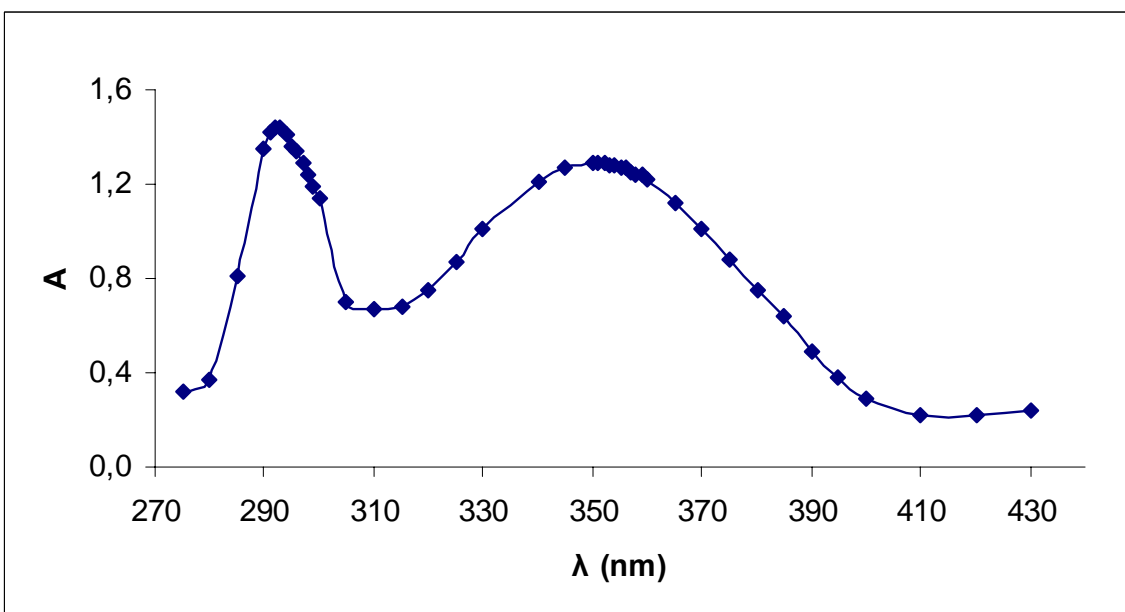
Graf 1: Absorpční spektrum neokyseleného roztoku



Graf 2: Absorpční spektrum roztoku okyseleného ředěnou HCl 1:10



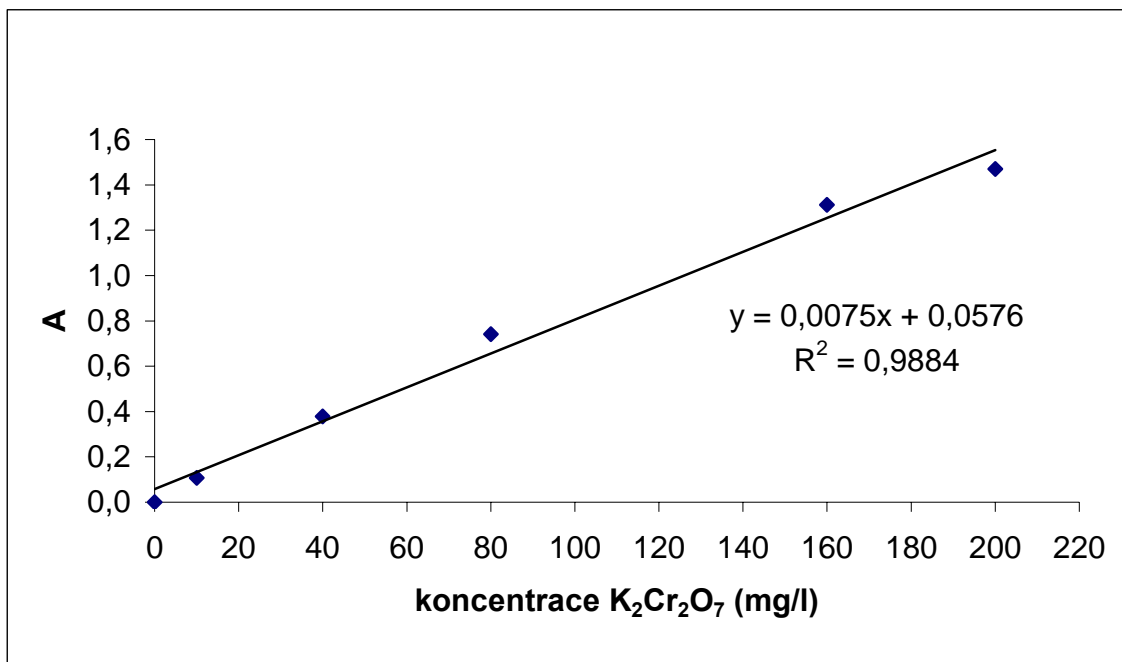
Graf 3: Absorpční spektrum roztoku okyseleného koncentrovanou H₂SO₄



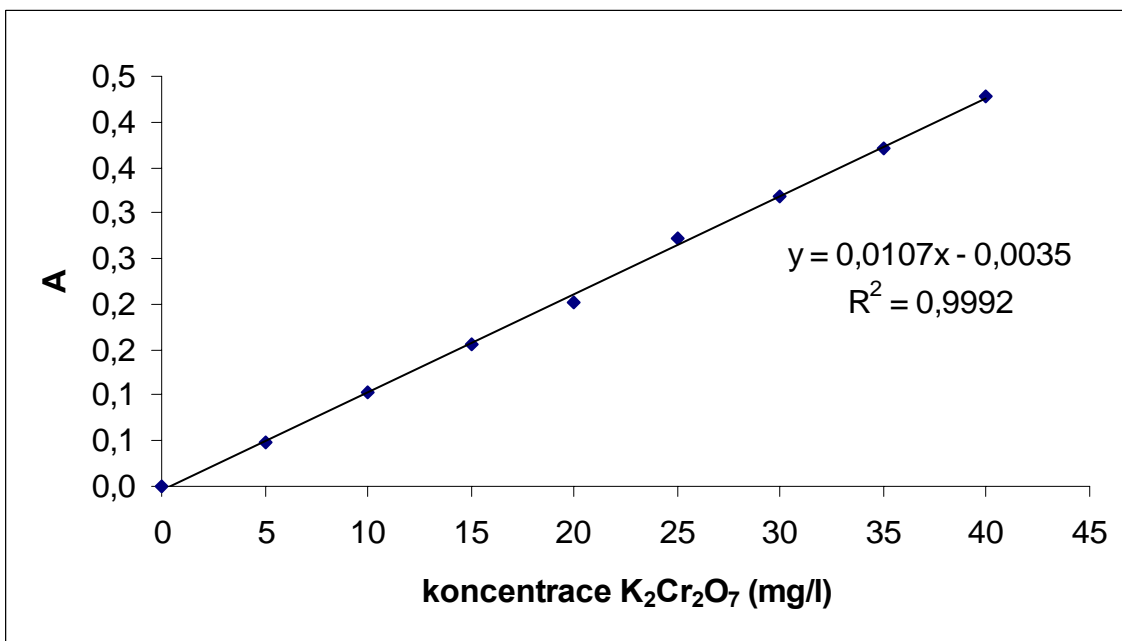
První koncentrační řada K₂Cr₂O₇ byla vytvořena pro kontrolu ředění. Menší koncentrační řada se měřila do koncentrace 40 mg/l, neboť pro samotný test se používaly velmi malé koncentrace.

Zásobní roztok K₂Cr₂O₇ o koncentraci 1 g/l byl ředěn do baněk o objemu 50 ml.

Graf 4: Koncentrační řada $K_2Cr_2O_7$ pro rozpětí koncentrací od 0 do 200 mg/l



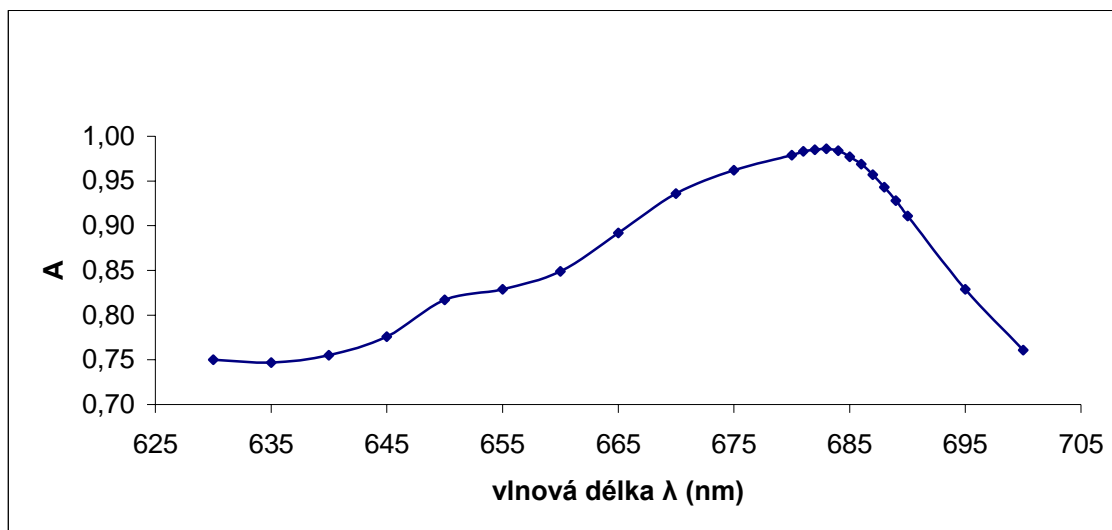
Graf 5: Koncentrační řada $K_2Cr_2O_7$ pro rozpětí koncentrací od 0 do 40 mg/l



4.2 Stanovení absorpčního maxima řasové kultury

Proměřením spektra mezi vlnovými délkami 300 – 800 nm bylo nalezeno absorpční maximum buněk řas při vlnové délce 683 nm. Oproti vlnové délce udávané ve zdroji [22] se lišilo pouze o 3 nm. Proto se dále vše týkající buněk řas měřilo při vlnové délce 683 nm.

Graf 6: Absorpční spektrum řas



První koncentrační řada buněk řas měla zjistit, jak moc se roztok buněk řas po určité době usadí. Změřená absorbance po 1,5 hod od naředění ukázala, že se řasy pomalu usazují a že při testu bude nutné před každým měřením roztoky důkladně protřepat.

Tab. 9: Tabulka usazování řas v závislosti na čase

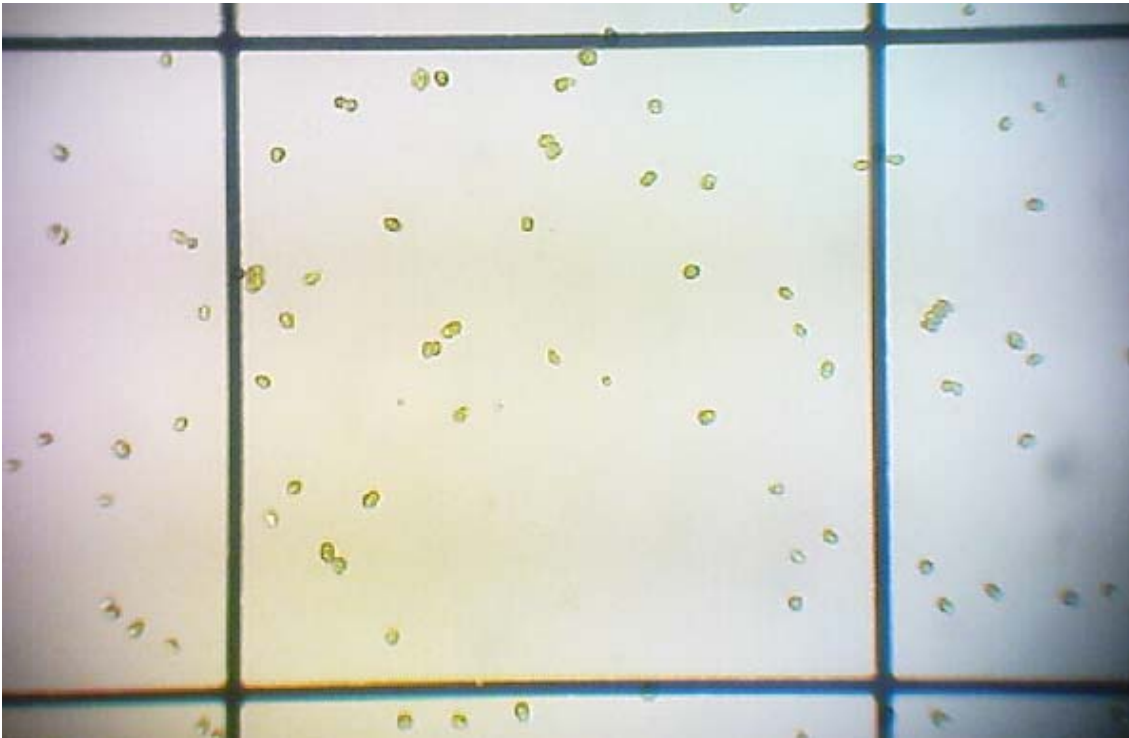
Roztok	Absorbance v 0 hod	Absorbance po 1,5 hod
1	0,125	0,116
2	0,053	0,049
3	0,022	0,020

4.3 Stanovení počtu buněk řas v zásobní kultuře

Sladkovodní řasa *Desmodesmus subspicatus*, dříve známý pod názvem *Scenedesmus subspicatus*, by se dle [3] měl vyskytovat jako coenobium po 4, event. po 8 buňkách, přičemž 4buněčná coenobia jsou vesměs tvořena řasou *Scenedesmus quadricauda*, avšak *Scenedesmus subspicatus* se může vyskytovat jak v coenobiích, tak také v buněčné formě.

V normě ČSN EN ISO 8692 je na straně 7 uvedena poznámka, že oba druhy řas jsou planktonní zelené řasy a v kultuře jsou obvykle jednobuněčné.

V dodané kultuře *Desmodesmus subspicatus* (CCALA, Botanického ústavu v Třeboni, AV ČR) se převážně vyskytovaly samostatné buňky řas. Pro počítání řasových kultur se běžně používají počty buněk nebo coenobií a z již výše uvedeného důvodu byly veškeré počty prováděny na počet řasových buněk (jedinců).



Obr. 11: *Scenedesmus subspicatus* pod mikroskopem při zvětšení 200 x

Spočítané buňky řas se sečetly a jejich počet se dosadil do rovnice (5). Tedy např. pro první součet 862 řas se tato hodnota dosadila do vzorce:

$$X = \frac{862 \cdot 1600}{0,01 \cdot 1.600} = 2,29 \cdot 10^5 \text{ buněk řas/ml}$$

Výsledek se potom musel vynásobit ředěním, tedy v prvním případě 10, jelikož byl roztok zředěn 10x. Výsledné číslo potom udávalo počet řas v zásobní kultuře v 1 ml.

$$X = 2,29 \cdot 10^6 \text{ buněk řas/ml}$$

Tab. 10: Roztok 1 ml zásobního roztoku řas s 9 ml destilované vody, odebráno 10 μ l, vyšetřeno 15 řad po 20 čtvcích, X násobeno 10

Vyšetřený řádek	Počet řas I	Počet řas II	Počet řas III	Počet řas IV	Počet řas V
1	59	41	31	86	62
2	81	45	42	80	57
3	54	43	27	87	54
4	62	50	33	77	54
5	52	41	26	68	51
6	64	40	23	51	53
7	60	46	28	64	51
8	62	49	16	66	51
9	57	48	20	64	64
10	60	62	38	60	74
11	54	49	25	66	55
12	53	39	26	60	76
13	49	46	31	60	49
14	52	33	32	50	51
15	43	42	17	53	61
Součet řas	862	674	415	992	863
Počet řas v 1 ml	2,29.10⁶	1,79.10⁶	1,11.10⁶	2,65.10⁶	2,30.10⁶

Tab. 11: Počty buněk řas pro zásobní kulturu

2 ml zásobní kultury řas naředěny do 10 ml destilovanou vodou					
Vyšetřeno 15 řad po 40 čtvcích, X násobeno 5					
Součet řas	2049	1096	1819	1738	-
Počet řas v 1 ml	2,73.10 ⁶	1,46.10 ⁶	2,43.10 ⁶	2,32.10 ⁶	-
1 ml zásobní kultury řas naředěn do 250 ml destilovanou vodou					
Vyšetřeno 20 řad po 40 čtvcích, X násobeno 250					
Součet řas	37	44	54	42	39
Počet řas v 1 ml	1,85.10 ⁶	2,2.10 ⁶	2,7.10 ⁶	2,1.10 ⁶	1,95.10 ⁶
0,5 ml zásobní kultury řas naředěno do 250 ml destilovanou vodou					
Vyšetřeno 20 řad po 40 čtvcích, X násobeno 500					
Součet řas	21	25	24	21	-
Počet řas v 1 ml	2,1.10 ⁶	2,5.10 ⁶	2,4.10 ⁶	2,1.10 ⁶	-

Ze všech vypočítaných čísel vyjadřujících počet řas v 1 ml se spočítala střední hodnota, která je rovna 2,25.10⁶ a zároveň se z těchto hodnot spočítala směrodatná odchylka.

Lze tedy říci, že počet buněk řas v 1 ml zásobní kultury je roven 2,25.10⁶ \pm 4,11.10⁵, tedy leží v intervalu <1,84.10⁶;2,66.10⁶>.

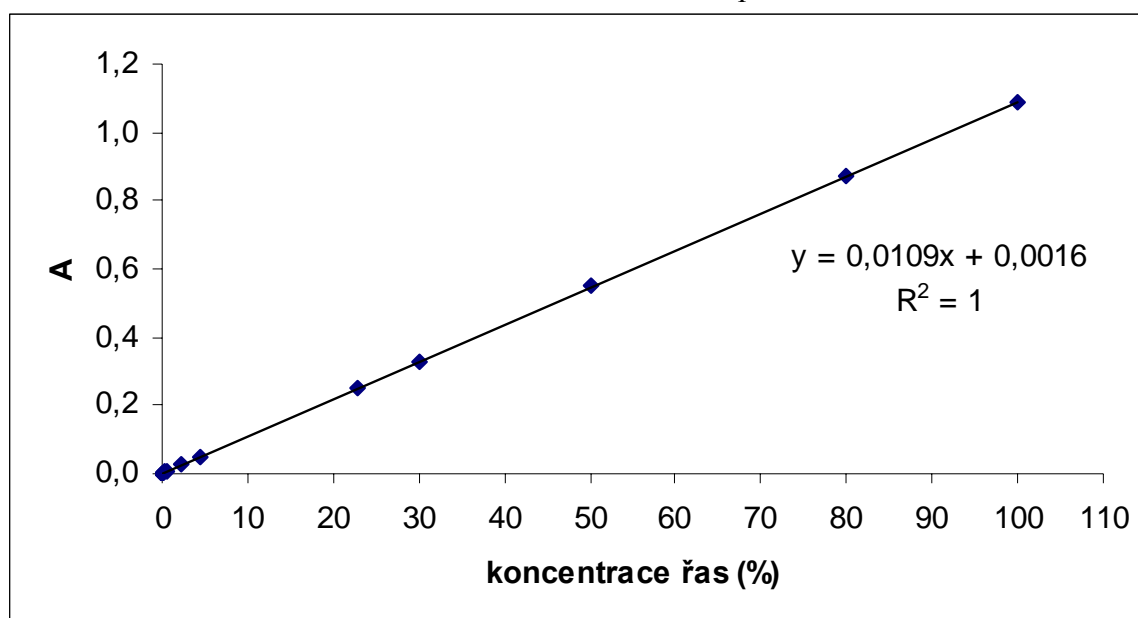
4.4 Korelace počtu buněk řas pod mikroskopem s fotometrickým měřením koncentrací řasových buněk

Pro korelaci počtu řas pod mikroskopem s spektrofotometrickým měřením řasových suspenzí bylo nejdříve nutné si dle navržené koncentrační řady spočítat objem zásobní kultury.

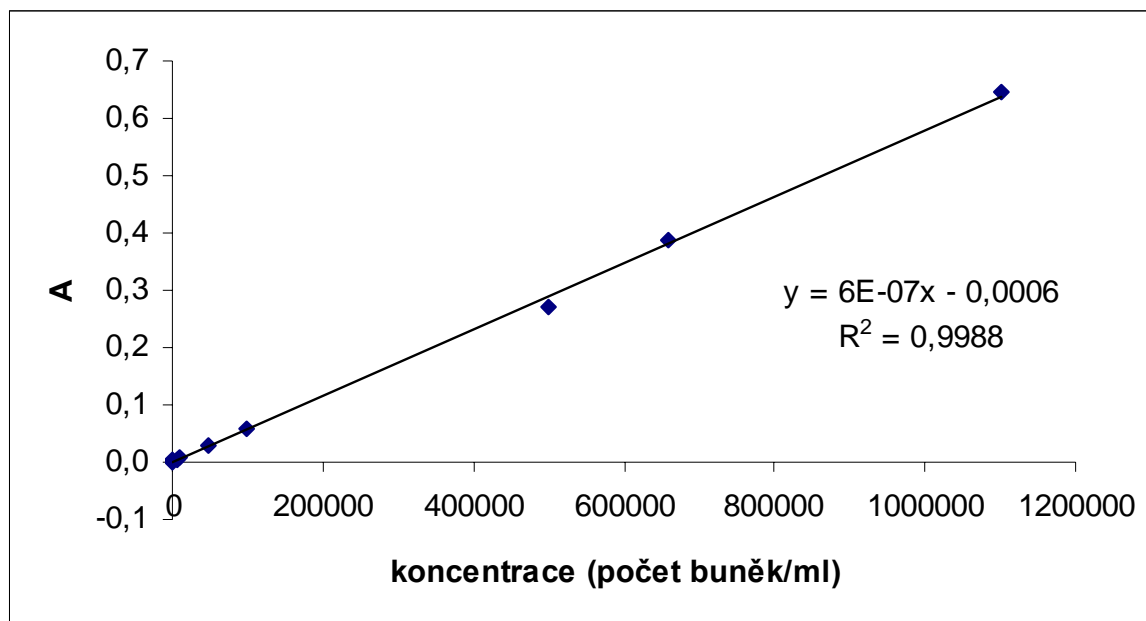
Tab. 12: Tabulka jednotlivých roztoků pro korelaci

Roztok	Navržená koncentrace (počet řas/ml)	Objem řas (μl)	Spočítaná koncentrace (počet řas/ml)	% koncentrace počtu řas	A
1	0,0	0	0,00	0,00	0,000
2	$1,00 \cdot 10^3$	22	$1,01 \cdot 10^3$	0,04	0,002
3	$5,00 \cdot 10^3$	22	$5,04 \cdot 10^3$	0,22	0,004
4	$1,00 \cdot 10^4$	45	$1,03 \cdot 10^4$	0,45	0,006
5	$5,00 \cdot 10^4$	220	$5,04 \cdot 10^4$	2,20	0,026
6	$1,00 \cdot 10^5$	450	$1,03 \cdot 10^5$	4,50	0,050
7	$5,00 \cdot 10^5$	2270	$5,20 \cdot 10^5$	22,70	0,249
8	$6,60 \cdot 10^5$	3000	$6,87 \cdot 10^5$	30,00	0,328
9	$1,10 \cdot 10^6$	5000	$1,12 \cdot 10^6$	50,00	0,552
10	$1,76 \cdot 10^6$	8000	$1,83 \cdot 10^6$	80,00	0,872
11	$2,29 \cdot 10^6$	10000	$2,29 \cdot 10^6$	100,00	1,090

Graf 7: Koncentrační řada buněk řas v destilované vodě proměřená metodou 27



Graf 8: Koncentrační řada buněk řas v živném médiu proměřená metodou 29



Samotné počítání buněk řas pro korelaci probíhalo stejným způsobem, jako se stanovoval počet buněk řas v 1 ml. Z každého roztoku bylo opět odebráno 10 μ l na Cyrusovu komůrku a bylo počítáno 20 řad po 40 čtvercích, tedy 800 čtverců. Každý roztok byl spočítán třikrát.

Tab. 13: Počítání buněk řas pro korelaci

Roztok 2	Počítání buněk řas I	Počítání buněk řas II	Počítání buněk řas III
Součet buněk řas	5	4	4
Počet buněk v 1 ml	$1,0 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^3$	$0,8 \cdot 10^3$
Roztok 3	I	II	III
Součet buněk řas	20	30	23
Počet buněk v 1 ml	$4,0 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^3$	$4,6 \cdot 10^3$
Roztok 4	I	II	III
Součet buněk řas	44	45	47
Počet buněk v 1 ml	$0,88 \cdot 10^4$	$0,9 \cdot 10^4$	$0,94 \cdot 10^4$
Roztok 5	I	II	III
Součet buněk řas	278	242	227
Počet buněk v 1 ml	$0,56 \cdot 10^5$	$0,48 \cdot 10^5$	$0,45 \cdot 10^5$

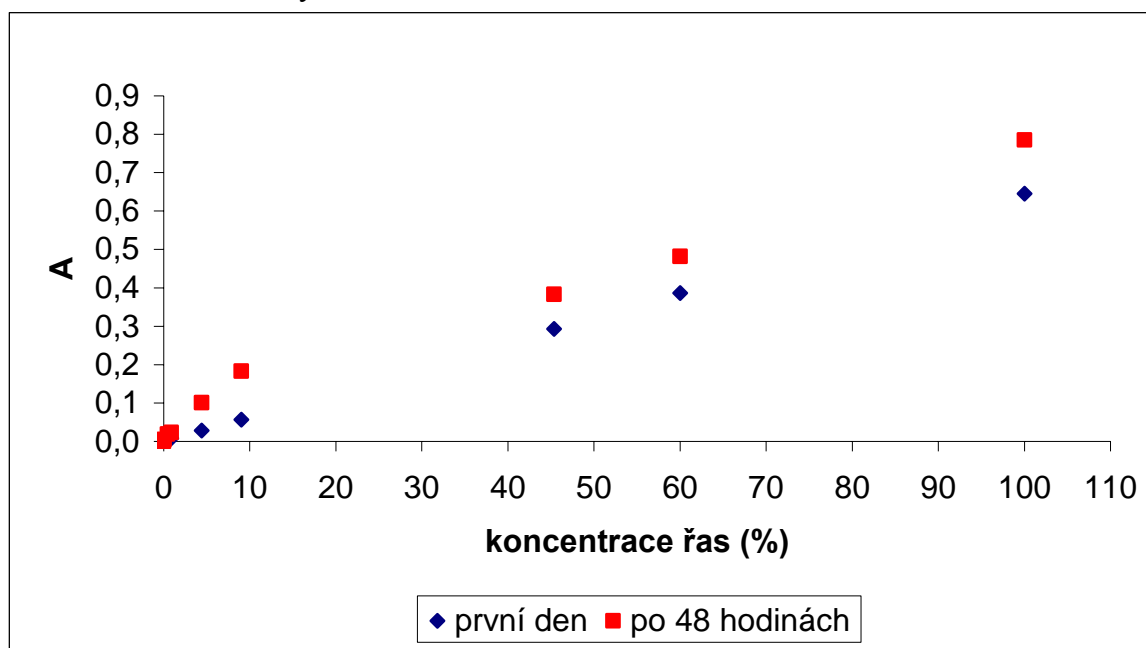
Tab. 14: Srovnání řasových buněk teoretickým výpočtem a spočítáním řasových buněk v roztocích pod mikroskopem

Roztok	Spočítaná konc. (počet řas/ml)	Prům. konc. (počet řas/ml)	Předpokládaný počet řas	Skutečný počet řas
1	0,00	0,00	0	0
2	$1,01 \cdot 10^3$	$0,87 \cdot 10^3$	1008	867
3	$5,04 \cdot 10^3$	$4,87 \cdot 10^3$	5038	4867
4	$1,03 \cdot 10^4$	$0,91 \cdot 10^4$	10305	9067
5	$5,04 \cdot 10^4$	$4,98 \cdot 10^4$	50380	49800

Vzhledem k naměřeným výsledkům lze říci, že koreluje počet buněk řas pod mikroskopem s jejich absorbancí v roztocích.

Po dvou dnech byla opět proměřena absorbance buněk řas v živném médiu metodou 29. Bylo zjištěno, že řasy exponenciálně rostou a mohly se proto použít pro samotné testování.

Graf 9: Růstové křivky roztoků řas v živném médiu v čase 0 a 48 hodin



4.5 Předkultivace

Do 100 ml živného roztoku bylo přidáno 315 μ l řas, přičemž výpočty se provedly stejně jako u korelace. Výsledná koncentrace v roztoku tedy byla $7,09 \cdot 10^3$ řas/ml.

Tab. 15: Absorbance předkultivací při nasazení a po 3 dnech

Roztok	A (0 hod)	A (72 hod)
S provzdušňováním	0,006	0,352
Bez provzdušňování	0,006	0,118

Po změření absorbancí bylo zjištěno, že v provzdušňovaném roztoku řasy rostly lépe, avšak za tři dny předkultivace se odpařila více než třetina živného roztoku. Z tohoto důvodu se při samotném testu baňky umístily do uzavřeného boxu, do něhož byl vzduch hadičkami přiváděn, ale nebyl zaveden do jednotlivých baněk. Test probíhal ve 25 ml živného roztoku a během tří dnů by se mohla jeho převážná část odpařit, což by negativně ovlivnilo výsledek testování, došlo by k zahuštění původní kultury.

4.6 Řasový test se standardem $K_2Cr_2O_7$

Byly provedeny čtyři řasové testy v různém rozpětí zkoušených koncentrací standardu $K_2Cr_2O_7$.

4.6.1 Řasový test A s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,75 – 0,9 mg/l

Pro první test se odebíralo inokulum z roztoku bez provzdušňování a byly zvoleny koncentrace 0; 0,75; 0,80; 0,85 a 0,9 mg $K_2Cr_2O_7$ /l.

Naměřená absorbance se dosadila do rovnice regrese koncentrační řady proměřené metodou 27:

$$\text{Rovnice regrese: } y = 0,0109x + 0,0016 \quad (6)$$

$$x = \frac{0,118 - 0,0016}{0,0109} = 10,68\%$$

Poté se z celkového počtu řas v zásobním roztoku spočítal počet řas v předkultivaci např.:

$$X = \frac{2,25 \cdot 10^6 \cdot 10,68}{100} = 2,40 \cdot 10^5$$

Z tohoto roztoku potom byly spočítány potřebné objemy pro jednotlivé koncentrace.

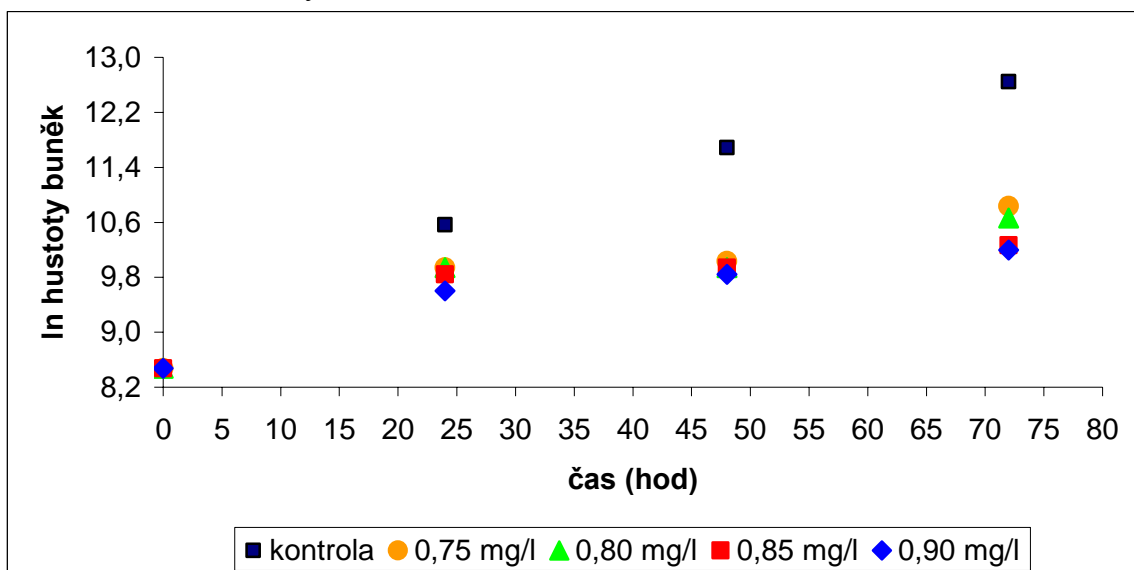
Tab. 16: Tabulka roztoků $K_2Cr_2O_7$

Roztok	Požadovaná koncentrace (mg/l)	Objem zásobního roztoku (μ l)
1	0,00	0
2	0,75	375
3	0,80	400
4	0,85	425
5	0,90	450

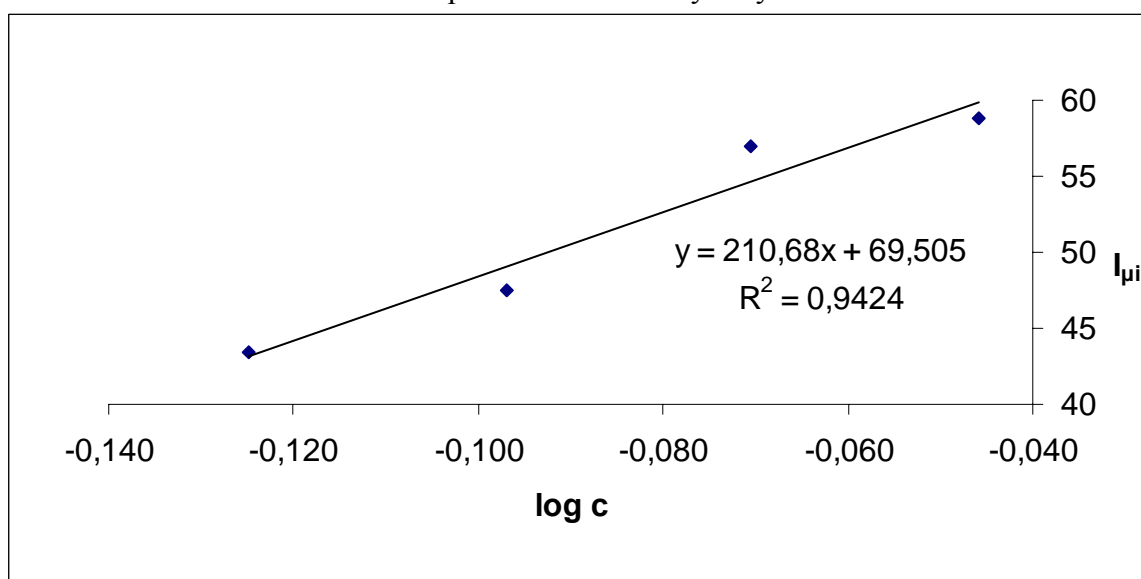
Tab. 17: Tabulka naměřených a vypočítaných hodnot prvního řasového testu

Roztok	A (0 hod)	A (24 hod)	A (48 hod)	A (72 hod)
1	0,004	0,021	0,061	0,157
2	0,004	0,012	0,013	0,027
3	0,004	0,012	0,012	0,023
4	0,004	0,011	0,012	0,016
5	0,004	0,009	0,011	0,015
Roztok	Počet buněk řas (0 hod)	Počet buněk řas (24 hod)	Počet buněk řas (48 hod)	Počet buněk řas (72 hod)
1	4800	38800	118800	310800
2	4800	20800	22800	50800
3	4800	20800	20800	42800
4	4800	18800	20800	28800
5	4800	14800	18800	26800
Roztok	μ 24	μ 48	μ (72 hod)	I_{μ}
1	0,087	0,044	0,058	0,000
2	0,061	0,031	0,033	43,430
3	0,061	0,031	0,030	47,539
4	0,057	0,028	0,025	57,038
5	0,047	0,023	0,024	58,763

Graf 10: Růstové křivky řasového testu



Graf 11: Inhibice růstu buněk řas porovnáním růstových rychlostí



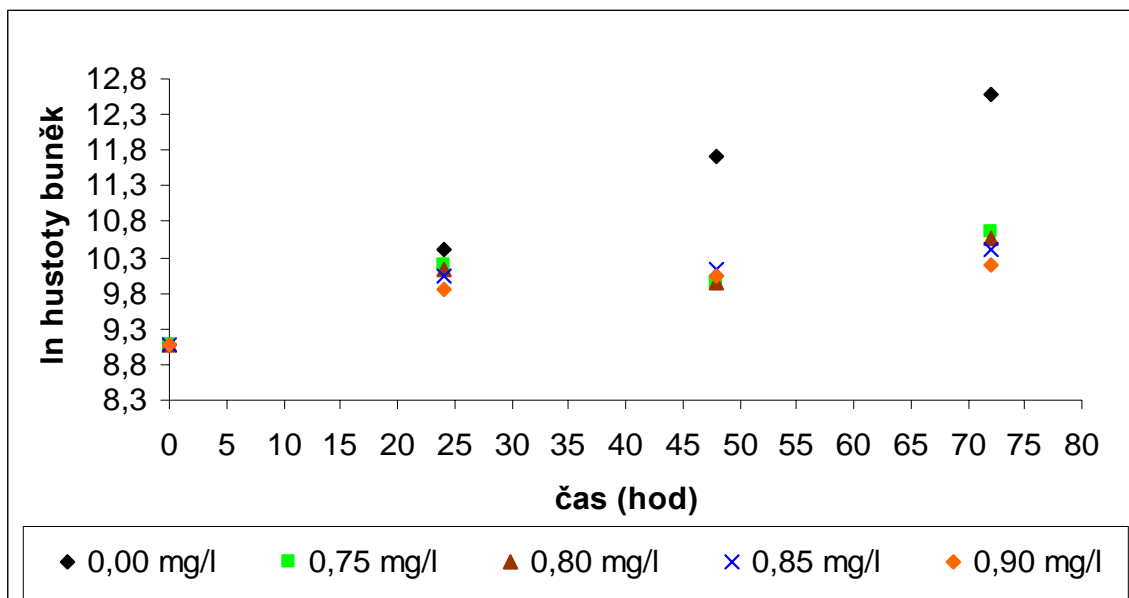
Dosažením hodnot 50 a 10 do rovnice regrese se získaly hodnoty $\log c$, jejichž odlogaritmováním se získaly konečné hodnoty E_rC_{10} a E_rC_{50} .

Tab. 18: Tabulka výsledných hodnot řasového testu dle ČSN EN ISO 8692

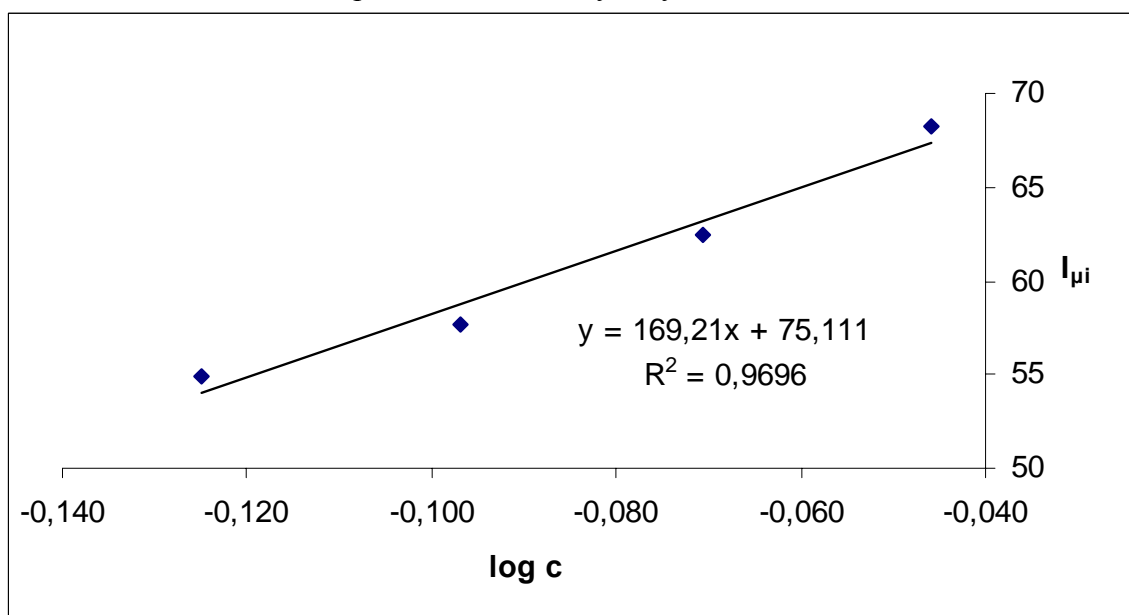
	log c	c (mg/l)
E_rC_{50}	-0,093	0,808
E_rC_{10}	-0,282	0,522

4.6.2 Řasový test B s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,75 – 0,9 mg/l

Graf 12: Růstové křivky řasového testu



Graf 13: Inhibice růstu řas porovnáním růstových rychlostí

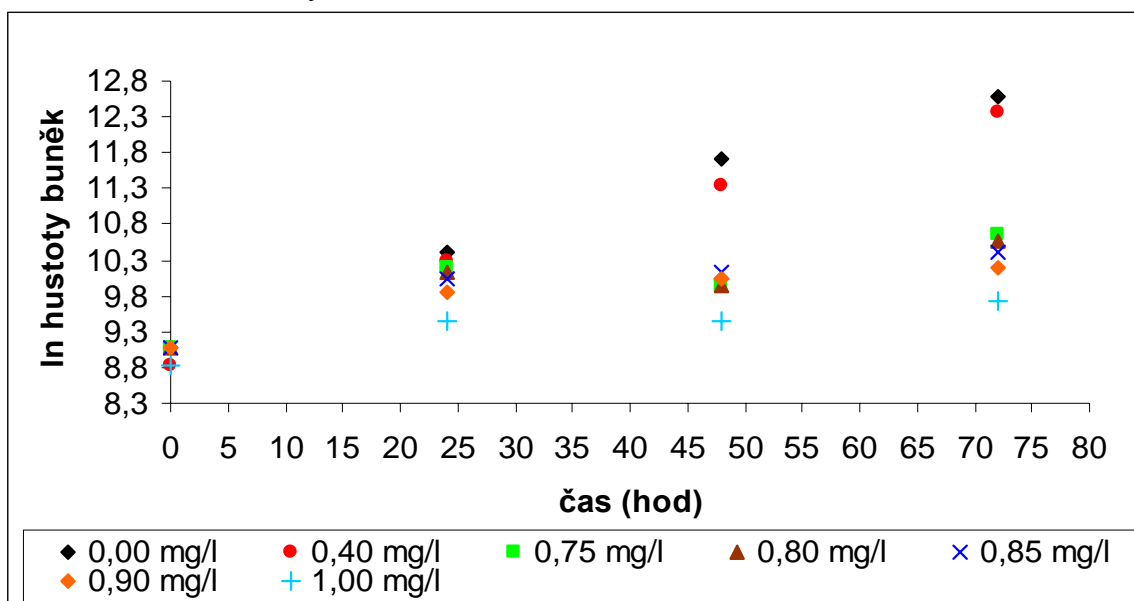


Tab. 19: Tabulka výsledných hodnot řasového testu dle ČSN EN ISO 8692

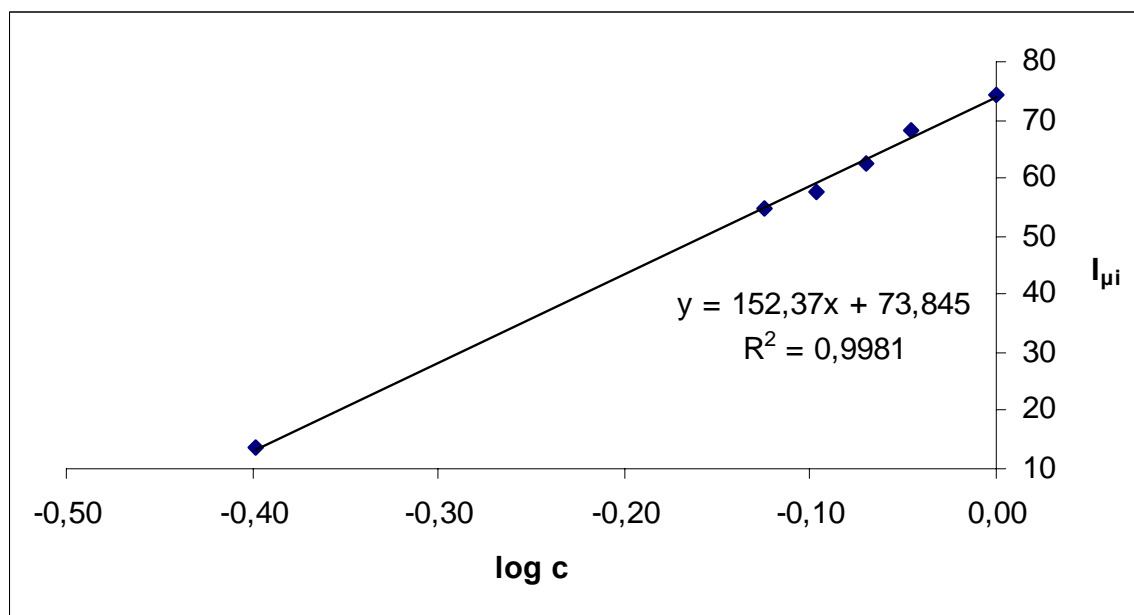
	log c	c (mg/l)
$E_r C_{50}$	-0,148	0,711
$E_r C_{10}$	-0,385	0,412

4.6.3 Řasový test s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,4 – 1 mg/l

Graf 14: Růstové křivky řasového testu



Graf 15: Inhibice růstu řas porovnáním růstových rychlostí

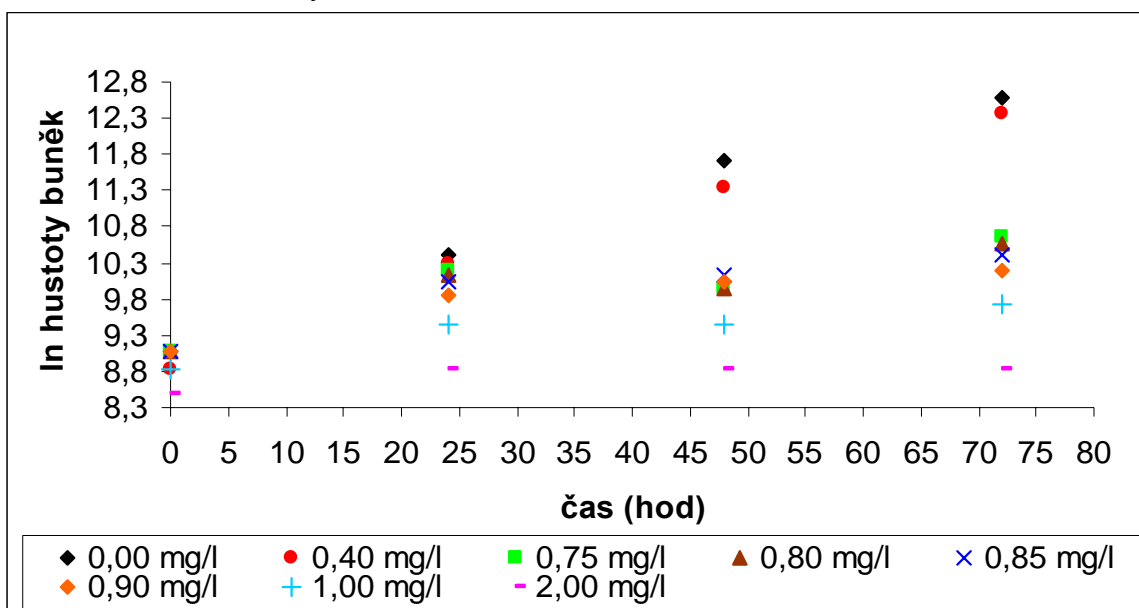


Tab. 20: Tabulka výsledných hodnot řasového testu dle ČSN EN ISO 8692

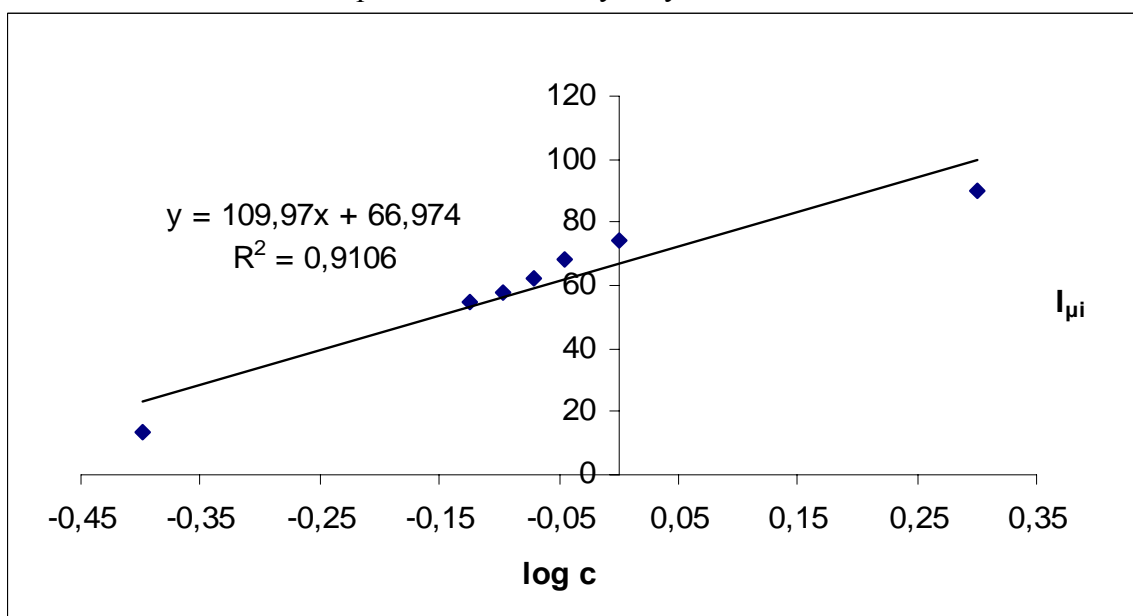
	log c	c (mg/l)
$E_r C_{50}$	-0,156	0,697
$E_r C_{10}$	-0,419	0,381

4.6.4 Řasový test s $K_2Cr_2O_7$ v rozpětí koncentrací 0,4 – 2 mg/l

Graf 16: Růstové křivky řasového testu



Graf 17: Inhibice růstu řas porovnáním růstových rychlostí



Tab. 21: Tabulka výsledných hodnot řasového testu dle ČSN EN ISO 8692

	log c	c (mg/l)
E_rC_{50}	-0,154	0,701
E_rC_{10}	-0,518	0,303

4.7 Shrnutí výsledků

Z výsledných hodnot čtyř řasových testů byly vypočítány průměry E_rC_{50} a E_rC_{10} a byly stanoveny směrodatné odchylky těchto efektivních koncentrací.

Tab. 22: Tabulka průměrných hodnot řasových testů

	$\bar{\sigma} E_rC_x$ (mg/l)	Směrodatná odchylka
E_rC_{50}	0,729	0,046
E_rC_{10}	0,405	0,079

Hodnota E_rC_{10} se tedy pohybovala v rozmezí $\langle 0,683; 0,775 \rangle$ mg/l a hodnota E_rC_{50} v rozmezí $\langle 0,326; 0,484 \rangle$ mg/l.

5 ZÁVĚR

Z provedených testů byla stanovena hodnota E_rC_{50} dichromanu draselného, zjištěná hodnota E_rC_{50} byla $0,729 \pm 0,046$ mg/l. V normě ČSN EN ISO 8692 se uvádí hodnota $0,84 \pm 0,12$ mg/l, to znamená výskyt hodnoty E_rC_{50} v intervalu $\langle 0,72; 0,96 \rangle$ mg/l. Lze tedy říci, že zjištěná hodnota vyhodnocená z provedených testů se nachází v intervalu hodnot, která je uvedena v normě ČSN EN ISO 8692. Na základě zjištěného výsledku je zvolená metodika a vybrané experimentální zařízení a uspořádání experimentu zcela vyhovuje standardním podmínkám testu dle ČSN normy.

Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas dle normy ČSN EN ISO 8692 je metoda časově velmi náročná. Vzhledem k tomu, že bylo nutné zjistit korelaci mezi počtem buněk řas pomocí mikroskopické techniky a spektrofotometrickým měřením, bylo nutné propočítat pod mikroskopem každou koncentraci roztoků řas několikrát. Potvrzením korelace mezi počtem buněk řas a spektrofotometrickým měřením, bylo možné používat k hodnocení řasového testu už pouze spektrofotometrické měření, a tím se tedy celé vyhodnocení experimentu velmi urychlilo. Ze zjištěné korelace vyplývá, že k vyhodnocování řasových testů lze s úspěchem využít spektrofotometrické techniky.

Protože řasový test trvá od nasazení testu po ukončení celkem 4 dny a v průběhu testu je nutné odečítání absorbance jedenkrát za 24 hodin, s využitím fotometrie se práce velmi urychlí a také se usnadní manipulace s řasovými kulturami a sníží se riziko kontaminace řasových kultur. Zároveň se dostatečně udrží standardní parametry testu a test tedy probíhá kontinuálně bez většího narušení.

V průběhu testování a z výsledků bylo zjištěno, že testování ovlivňuje nejen provzdušnění, ale i osvětlení. Provzdušňování by bylo vhodné pro každou zkoušenou koncentraci zvláště, neboť řasy lépe rostly. Bylo by ale nutné zabránit velkému odpařování (téměř třetinového objemu) a tím zahuštění řasové suspenze, bez něhož by pak výsledky testu mohly být do určité míry zkreslené. Z tohoto důvodu se jako nejvhodnější jeví způsob velmi intenzivního provzdušňování celého boxu.

Také byl sledován vliv osvětlení. U dvou roztoků o stejné koncentraci, které měly na počátku testu totožnou absorbanci, tudíž i koncentraci buněk, se během 3 dnů testování výsledná absorbance řasové kultury velmi lišila, což bylo provedeno experimentem se standardním osvětlením a osvětlením s nižší intenzitou, jak bylo zdokumentováno na obrázku č. 10. Pro úspěšný růst řasové kultury je tedy nutné zajistit osvětlení v rozsahu 6 000 – 10 000 lux a pro rovnoměrnější rozptýlení osvětlení je vhodné box světelně odstínit od okolí, což může být realizováno pomocí hliníkové fólie (alobalu, alu fólie, lepicí stínící fólie).

Práce potvrdila možnost realizace testu v podmínkách ekotoxikologické laboratoře č. 4059 Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí, FCH VUT v Brně. Zavedení řasového testu umožňuje další práce v oblasti ekotoxikologie na Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí s využitím řasových testů, a tím se také rozšíří spektrum již prováděných testů v této laboratoři ekotoxikologie.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Maršálek, B.: *Mikrobiotesty – druhá generace ekotoxikologických biotestů*. [online]. [cit. 2009-03-20] Dostupné z: http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/Prehled_mikrobiotestu.pdf
- [2] Duffus, J. H. and Worth, H. G. J.: *Fundamental toxicology for chemists*. Cambridge, the Royal Society for Chemistry, 1996. 327 p., ISBN 0-85404529
- [3] Ambrožová, J.: *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vydání, Skriptum VŠCHT, Praha, 2001. 226 s., ISBN 80-7080-521-8
- [4] Štěpánek, M. & kol.: *Hygienický význam životních dějů ve vodách*. Avicenum Zdravotnické nakladatelství, Praha, 1979. 588 s.
- [5] *Vodní ekotoxikologie*: [online]. [cit. 2008-11-19] Dostupné z: ekologie.upol.cz/ku/ahdo/EKOTOX.DOC
- [6] Häusler, J.: *Sledování toxicity a fyziologické aktivity mikroorganismů ve vodním prostředí*, VTEI č.7 – 8, 1978. s. 267 – 274
- [7] Máchová, J., Svobodová, Z. & Vykusová, B.: *Ekotoxikologické hodnocení výluhů a tuhých průmyslových odpadů*. VÚRH Vodňany, 1994. 51 s.
- [8] Svobodová, Z., Máchová, J. & kolektiv: *Ekotoxikologie – praktická cvičení, část II*. Diagnostika havarijních úhynů ryb a dalších vodních živočichů. Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2000. 134 s.
- [9] Říhová Ambrožová, J.: *Biologické testy toxicity*. From *Encyklopedie hydrobiologie : výkladový slovník* [online]. [cit. 2009-01-22]. Praha, VŠCHT Praha, 2007. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-06/ebook.html?p=B023
- [10] Pouličková, A., Jurčák, J.: *Malý obrazový atlas našich sinic a řas*. 1. vyd., Olomouc, Univerzita Palackého, 2001. 81 s., ISBN: 80-244-0242-4
- [11] Sládečková, A. & Sládeček, V.: *Hydrobiologie*. Praha, Skriptum ČVUT, 1995. 141 s.
- [12] Štěpánek, M. & kol.: *Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví*. Avicenum Zdravotnické nakladatelství, Praha, 1982. 408s.
- [13] Soldán, P.: *Stanovení hlavní složky znečištění způsobující toxicitu odpadních vod*, VTEI č.4/1997, 1997. s. 154 – 157
- [14] ČSN EN ISO/IEC 17 025: *Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří*. ČNI Praha, 2001. 46 s.
- [15] Maršálek, B. & Lukavský, J.: *Inovační trendy v ekotoxikologických biotestech*. Zborník X. Limnologické konferencie, Stará Turá, 1994. s. 135 – 138
- [16] Sládeček, V., Zelinka, M., Marvan, P. & Rothstein, J.: *Československá vodohospodářská toxikologie*. *Vodní hospodářství B* 25 (5), 1975. s. 137 – 140
- [17] Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, G. A., Jr. And Cairns, J., Jr.: *Handbook of Ecotoxicology*, 2nd Edition, Boca Raton, Lewis Publishers, Florida, 2003. 1290 p., ISBN 1-56670-546-0
- [18] Dvořáková, D.: *Řasové testy toxicity*. Doktorská disertační práce, Brno, VŠVF, 1999. 89s.
- [19] Maršálek, B., Lukavský, J.: *The evaluation of toxicity by biosensor with immobilized alga Selenastrum capricornutum*. *Algological Studies*. 1989. p. 234 – 239

- [20] Giesy, J. P. and Hoke, R. A.: *Freshwater sediment quality criteria: Toxicity bioassessment, in Sediments*. Chemistry and Toxicity of In-Place Polutants, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1989. 265 p.
- [21] Fletcher, J. S.: *Use of algae versus vascular plants to test for chemical toxicity*, in *Plants for Toxicity Assessment*, ASTM STP 1091, Wang, W., Corsuch, J. W. and Lower, W. R., Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1990, 33 p.
- [22] Maršálek, B., Lukavský, J.: *Řasové testy trofie a toxicity*. RECETOX [online]. [cit. 2008-12-26]. Dostupné z: http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/RasoveTestyPrehled.pdf
- [23] ČSN EN ISO 8692: *Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas*. Praha. Český normalizační institut, 2005. 17 s.
- [24] Matulová, D.: *The application of Algae as Test Organism*. Arch. Protistenkd. 139, 1991. p. 279 – 289
- [25] Tölgyessy, J., a kolektiv: *Chémia, biológia a toxikológia vody a ovzdušia*. 2. vydanie, Bratislava, Veda, 1989. 530 s., ISBN 80-224-0034-3
- [26] *Skripta pro velkou fykologii*, [online]. [cit. 2009-05-17] Fykologická laboratoř na Přírodovědecké fakultě JU v Českých Budějovicích, 2003 – 2009. Dostupné z: <<http://www.sinicearasy.cz/134/uvod>>
- [27] Kalina, T.: *Systém a vývoj sinic a řas*. Skriptum PřFUK Praha, Vydavatelství Karolinum, 1994. 165 s.
- [28] *Skripta pro velkou fykologii*, [online]. [cit. 2009-04-19] Fykologická laboratoř na Přírodovědecké fakultě JU v Českých Budějovicích, 2003 – 2009. Dostupné z: < <http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorophyceae>>
- [29] Payne, A. G., Hall R. H.: A Method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals, *Aquatic toxicology*, 1979. STP 667, American society for Testing and Materials, Philadelphia, p.171,
- [30] Blaise, C., Legault, R., Bermingham, N., van Coillie, R. and Vasseur, P. A.: A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment*, 1986. vol.1, p.261
- [31] Bozeman, J., Koopman, B. and Bitton, G.: Toxicity testing using immobilized algae. *Aquatic Toxicology*, 1989. vol.14, p.345
- [32] Svobodová, Z.: *Ekotoxikologie - praktická cvičení : Část I. Testy toxicity na organismech vodního prostředí*. Brno, 1. vyd., VFU, 2000. 70 s. ISBN 80-85114
- [33] Pavlíková, D., Pavlík, M., Matějů, L. & Balík, J.: *Ekotoxikologie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 2001. ISBN 80-244-0242-4
- [34] Kvíderová, J., Lukavský, J.: Gradienty – základní charakter prostředí a možnosti jejich modelování v laboratoři. *Czech phycology*, Olomouc, 2001. č.1, s. 77 – 86
- [35] Erikson, C., Harrass, M. C., Osborne, C. M., Sayre, P. G. and Zeeman, M.: *Environmental Technical Assessment Assistance Handbook*, Food and Drug Administrations PB 87-175345, NTIS, 1987, Springfield, VA,
- [36] Blaise, C.: Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility and prospects. *Environmental Toxicology Water Qual.*, 1991. vol. 6, p. 145
- [37] Gaur, J. P. and Singh, A. K.: Regulatory influence of light and temperature on petroleum toxicity to *Anabaena doliolum*. *Environmental Toxicology Water Chem.*, 1991. vol. 6, p. 341

- [38] Smith, P. D., Brockway, D. L. and Stancil, F. E.: Effects of hardness, alkalinity and pH on the toxicity of pentachlorophenol to *Selenastrum capricornutum* (Prinz). *Environmental Toxicology Chemistry*, 1987. vol. 6, p. 891 – 900
- [39] Skowronski, T., Szubinska, S., Pawlik, B., Jakubowski, M., Bilewicz, R. and Cukrowska, E.: The influence of pH on cadmium toxicity to the green alga *Stichococcus bacillaris* and on the cadmium forms present in the culture medium. *Environmental Pollution*, 1991. vol. 74, p. 89
- [40] Stein, J. R., Ed.: *Handbook of Phycological Methods*, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1973
- [41] Fogg, G. E.: *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*, 2, University of Wisconsin Press, Madison, 1975
- [42] Adams, N. and Dobbs, A. J.: A comparison of results from two test methods for assessing the toxicity of aminotriazole to *Selenastrum capricornutum*, *Chemosphere*, 1984. vol. 13, p. 965
- [43] Hall, J., Healey, F. P. and Robinson, G. G. C.: The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in chemostat cultures of *Chlorella*. *Aquatic Toxicology*, 1989. vol. 14, p. 15
- [44] Newman, M. C.: *Fundamentals of Ecotoxicology*. 1st edition, CRC Press LLC, USA, 1998. 402 p., ISBN 1-57504-013-1
- [45] Walsh, G. E., Deans, C. H. and McLaughlin, L. L.: Comparison of the EC50's of algal toxicity tests calculated by four methods. *Environmental Toxicol. Chem.*, 1987. vol. 6, p. 767
- [46] ČSN 75 7712: *Jakost vod – Biologický rozbor – Stanovení biosestonu*. Praha, Český normalizační institut, 2005. 3s.
- [47] Černý, J., Novák, A.: Jsou spektrofotometrická měření přesná a správná?. *CHEMagazín*, 2007, roč. XVII, č.6, 40s.. ISSN 1210-7409

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ISO	– International Organization for Standardization
OECD	– Organisation for Economic Co-operation and Development
U.S. EPA	– U.S. Environmental Protection Agency
ASLAB	– Akreditační středisko laboratoří
ČIA	– Český institut pro akreditaci
CCALA	– Culture Collection of Autotrophic Organisms
X	– počet buněk řas v 1 ml
a	– počet jedinců nebo buněk v n čtvercích
n	– počet vyšetřených čtverců
z	– zahuštění vzorku
K	– celkový počet čtverců v komůrce
V	– objem komůrky
μ	– specifická růstová rychlost
t_0	– doba začátku zkoušky
t_L	– doba ukončení zkoušky
x_0	– jmenovitá počáteční hustota buněk
x_L	– hustota buněk měřená v době t_L
$I_{\mu i}$	– inhibice v procentech pro zkoušenou koncentraci i
μ_i	– střední růstová rychlost pro zkoušenou koncentraci i
μ_c	– střední růstová rychlost u kontrolního vzorku
$E_r C_x$	– efektivní koncentrace zkoušeného vzorku, která má za následek $x\%$ snížení specifické růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolním vzorkům
$E_r C_{50}$	– efektivní koncentrace zkoušeného vzorku, která má za následek 50% snížení specifické růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolním vzorkům
$E_r C_{10}$	– efektivní koncentrace zkoušeného vzorku, která má za následek 10% snížení specifické růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolním vzorkům
$\bar{}$	– průměr
A	– absorbance
c	– koncentrace
λ	– vlnová délka