

MAGISTERSKÁ PRÁCE BIOLOGICKÉ FAKULTY

JIHOČESKÉ UNIVERSITY



CITLIVOST ŘASOVÉHO BIOTESTU ISO 10253

K PŘÍTOMNOSTI HERBICIDU DCMU

V MOŘSKÉ VODĚ

Julie Soukupová

Vedoucí práce: RNDr. Jaromír Lukavský, Csc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, s použitím uvedené literatury.

Třeboň, 25. dubna 1998

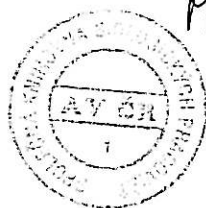
ABSTRACT

ISO 10253 serves as an international standard procedure describing how to use marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* to test toxicity of seawater pollutants. The toxicity is reflected in reduced growth rate of the diatoms. The bioassay is non-specific, cost effective screening procedure.

Here, we investigated the sensitivity of the bioassay to admixtures of herbicides representing the water pollution originating from agriculture. Diuron (DCMU) is one of the best-characterized herbicides that inhibit the electron transfer through Photosystem II (PSII) of plants.

The titrations of oxygen evolution capacity and of fluorescence emission by the herbicide yielded the apparent dissociation constant $K_{app} \approx 80$ nM and the average number of chlorophyll molecules per PSII reaction center ($Chl/PSII \approx 250$). The 50% inhibition in the biotest (EC_{50}) was found much above K_{app} : around or above 250 nM DCMU. The difference between the immediate response of the photosynthetic apparatus to the herbicide (K_{app}) and the sensitivity of the biotest (EC_{50}) can be explained by a selection of herbicide resistant cells and by their adaptation to sublethal herbicide concentrations.

It is concluded that *Phaeodactylum triconutum*, the organism used in ISO 10253, is not sufficiently sensitive to detect herbicides at concentrations common in natural waters. Sensitivity of the bioassay can be increased and bioassay duration can be reduced by measuring fluorescence emission instead of cell counts or instead of turbidity measurements. Results obtained with newly constructed fluorometric CCD camera are presented.



MP 78. v-1-

30 280

KEYWORDS: bioassay, ISO 10253, diatom, *Phaeodactylum tricorutum*, fluorescence, oxygen evolution, herbicide, Photosystem II

OBSAH

VYSVĚTLIVKY ZKRATEK	iii
1. ÚVOD	1
1.1. Řasové biotesty	2
1.1.1. Biotesty <i>ISO 8692</i> a <i>ISO 10253</i>	3
1.2. Fotosyntéza.....	4
1.2.1. Reakční centrum fotosystému II.....	5
1.2.2. Přeměny energie v thylakoidní membráně.....	5
1.3. Fluorescenční emise.....	7
1.3.1. Herbicidy a fluorescenční indukce	8
2. CÍL PRÁCE	10
3. MATERIÁL A METODY	11
3.1. Organismus.....	11
3.2. Herbicid	12
3.3. Biotest.....	12
3.3.1. Kultivační médium.....	12
3.3.2. Inokulace	13
3.3.3. Inkubace	13
3.3.4. Měření přírůstku biomasy.....	14
3.3.5. Vyhodnocování inhibice růstu.....	14
3.3.6. Stanovení koncentrace chlorofylu	16
3.3.7. Světelná mikroskopie.....	16
3.4. Měření fotosyntetického vývoje kyslíku	18
3.5. Měření Q_A reoxidace fluorescenční emisí.....	19
4. VÝSLEDKY METODICKÉ.....	21
4.1. Experimentální výsledky	21
4.1.1. Světelná křivka.....	21
4.1.2. Vliv rozpouštědla na experimenty s herbicidy.....	22
4.1.3. Chyba měření fotosyntetického vývoje kyslíku.....	23
4.2. Teoretický popis inhibice fotosystému II herbicidem.....	23
4.3. Experimentální prověření teoretického modelu.....	25

5. VÝSLEDKY BIOTESTU	26
5.1. Titrace fotosyntetického vývoje kyslíku diuronem.....	27
5.2. Titrace kinetiky Q_A reoxidace diuronem.....	27
5.3. Biotest.....	29
5.3.1. Vyhodnocení biotestu na základě hustoty buněk	30
5.3.2. Vyhodnocení biotestu na základě optické hustoty při 750 nm .	31
5.3.3. Koncentrace chlorofylu.....	33
5.3.4. Srovnání hodnot EC50 zjištěných různými metodami	33
6. NÁVRH VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ CCD KAMERY	34
7. DISKUSE.....	36
8. ZÁVĚR	38
9. SEZNAM LITERATURY	39

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli RNDr. Jaromíru Lukavskému Csc. za možnost pracovat na zajímavé práci, za jeho ochotu i za připomínky k textu. Můj vřelý dík patří RNDr. Ladislavu Nedbalovi Csc. za vedení při experimentech, revize a zejména za neutuchající dobrou náladu a optimismus, které mi byly oporou během mého pobytu na Mikrobiologickém ústavu. Dále děkuji všem pracovníkům Mikrobiologického a Botanického ústavu, kteří mi pomáhali v práci a svým rodičům, kteří mě podporovali.

Chci poděkovat také svému psu Alexovi, že byl se mnou ve chvílích intelektuálních výbojů i ve chvílích pochyb. Neopustil mě ani v okamžicích, kdy jsem pochybovala, zda mi za to blaho lidstva, k němuž touto prací přispívám, vůbec stojí... ☺

VYSVĚTLIVKY ZKRATEK

DCMU	3 - [3,4 - dichlorfenyl] - 1,1 - dimethyl - močovina
EC10	Koncentrace herbicidu způsobující 10ti % redukci růstu nebo růstové rychlosti
EC50	Koncentrace herbicidu způsobující 50ti % redukci růstu nebo růstové rychlosti
F _m	Maximální fluorescence
F _o	Minimální fluorescence
F _v	Variabilní fluorescence
ISO 10253	Směrnice biotestu pro mořské vody
K _{app}	Zdánlivá disociační konstanta
NOEC	Nejvyšší koncentrace herbicidu, která ještě nezpůsobuje významnou redukci růstu nebo růstové rychlosti
OEC	Komplex oxidující vodu
P680	Primární donor elektronů fotosystému II
P680*	Excitovaný P680
P700*	Excitovaný primární donor fotosystému I
PC	Plastocyanin
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
PSIIRC	Reakční centrum fotosystému II
PSIRC	Reakční centrum fotosystému I
Q _A	Primární akceptor elektronů
Q _B	Sekundární akceptor elektronů
RC	Reakční centrum
[RC]	Koncentrace reakčních center

1. ÚVOD

Změna životního prostředí, ke které došlo za posledních 200 let (od začátku průmyslové revoluce do dneška), je svým rozsahem srovnatelná jen s klíčovými změnami, ke kterým v minulosti Země docházelo jen velmi zvolna, s časovou konstantou v řádu nejméně stovek tisíc let. Koncentrace atmosferického CO₂ stoupla z ca. 27 Pa na počátku 19. století na současných ca. 35 Pa parciálního tlaku. Došlo k antropogenní redukci ochranné vrstvy stratosférického ozónu. Naopak v troposféře se ozón spolu s dalšími polutanty hromadí. Znečištění ovlivňuje v nemenší míře i půdu a vody. Voda je znečišťována odpadem lidských sídel, ale hlavně průmyslem, dopravou a zemědělstvím.

Tato diplomová práce byla provedena v rámci řešení projektu Evropské komise INCO-Copernicus „Znečištění Černého moře oleji a herbicidy. Nové techniky detekce a studium biologických důsledků.“ Příspěvek byl zaměřen na znečištění herbicidy, které dobře reprezentují negativní ovlivnění jakosti vody zemědělstvím. Herbicidy jsou stále velmi široce používány v zemědělství jako levný prostředek likvidace a kontroly nežádoucích plevelů. Při jejich aplikaci dochází k znečištění půdy ať již přímo nebo nepřímo z ošetřovaných rostlin. Opakovaným používáním dochází k akumulaci v půdě a splachy z povodí se dostávají do vodních toků a moří (Rauscherová et al., 1995). Jsou známy případy, kdy koncentrace herbicidů dosáhly kritických hodnot např. koncentrace atrazinu až 80nM v řekách a rybnících těsně po jeho aplikaci (Snegaroff, 1976), koncentrace triazinu 200 nM v Dunaji (Kuthan, 1985). Kritickou situací v jiných evropských řekách se zabýval Buser (1990). Současná situace Černého moře je alarmující (Kravčuk et Punko, 1996). Produkty rozpadu herbicidů jsou karcerogenní a z tohoto důvodu jsou zavedené maximální povolené koncentrace v řekách a mořích. Tím nabývají na praktické důležitosti detekční metody včetně biotestu, kterým se zabývám v této práci. Biotest také může přispět k zhodnocení přímého vlivu herbicidů na fytoplankton (Goldsborough et Robinson, 1984; Francois et Robinson, 1990; Kasai et al., 1993). I nízké koncentrace herbicidů mohou ovlivnit kompetitivní schopnost jednotlivých druhů řas natolik, že se ve vodním ekosystému změni druhové složení (Jay et al., 1997; Shehata et al., 1995). Proto je nutná co nejvyšší citlivost metod detekce herbicidů, neboť fytoplankton je zodpovědný až za 70% produkce světového atmosferického kyslíku (Reynolds, 1984) a tedy i za odpovídající množství fixace CO₂. Řasy jsou primárními producenty, podmiňují existenci dalších článků trofického

řetězce ve sladkých i slaných vodách. Vliv jakýchkoliv znečišťujících látek a jedů na řasy je tedy zásadní i pro funkci všech vodních ekosystémů.

Jako herbicidy se využívají triaziny, fenylmočovinové deriváty, triazinony, uracily, fenoly a další chemické sloučeniny (Jat et al., 1997). Zde jsme si jako modelový systém vybrali herbicid diuron (DCMU), který sehrál velmi výraznou úlohu ve fotosyntetickém výzkumu (Draber et al., 1991; Good, 1961; Izawa, 1997) a je proto velmi dobře charakterizován. Patří mezi deriváty fenylmočoviny. U fototrofních organismů působí tento herbicid, podobně jako mnoho dalších, jako inhibitor fotosyntetického přenosu elektronů na akceptorové straně fotosystému II (PSII) rostlin (Vermaas, 1984). Tato skutečnost byla experimentálně potvrzena v roce 1963 (Duysens et Sweers, 1963). Citlivost řasového biotestu k přítomnosti herbicidů je omezena skutečností, že fotosyntéza je omezována elektronovým transportem v PSII jen za nízkých ozářeních a že ani za této podmínky nelze s jistotou předpokládat prostou úměrnost mezi růstovou rychlostí a elektronovým transportem přes PSII. Rovněž je možné, že citlivost biotestu bude ovlivněna adaptací organismu na přítomnost subletálních koncentrací herbicidu (Shehata et al., 1995) a selekcí resistantních jedinců.

Z těchto důvodů jsem se rozhodla citlivost biotestu k přítomnosti herbicidů podrobněji prozkoumat.

1.1. Řasové biotesty

Znečištění vody se obvykle charakterizuje analytickými metodami. U herbicidů jde především o plynovou nebo kapalinovou chromatografii. Ačkoliv jsou tyto metody velmi přesné, jsou investičně i materiálově náročné. Rovněž, v závislosti na složení chromatografického sloupce a metodě detekce, jde o metody citlivé jen k určitým třídám látek. Proto si uchovávají svou důležitost nespecifické řasové biotesty (Marvan, 1976). Historie biologických testů sahá v naší republice až do začátku 50. let (Prát et Pospišil, 1951). Od té doby bylo testováno na řasách velké množství toxických látek (Bringmann et Kühn, 1978; Kubín, 1994; Rojíčková-Padrťová, 1998). Souhrn bibliografie o řasových testech do konce 80. let uvádí Lhotský (1979).

V Evropě jsou výsledky řasových testů toxicity nutné k registraci nových chemických látek (Haglund, 1997).

Řasovým biotestem rozumíme hlavně růstový inhibiční test v umělém médiu s přidanou testovanou chemikálií (ISO 10253, ISO 8692) nebo v přírodní vodě neznámého znečištění. (Lukavský et al., 1995). Podle míry inhibice růstu pěstovaných řas usuzujeme na míru toxicity daného vzorku. Toxický faktor ovlivňuje růstovou rychlost řasové kultury a maximální dosažitelnou hodnotu řasové biomasy, výtěžek (Marvan et Přibil, 1976). Používají se jednodruhové axenické kultury řas v suspenzi (Lukavský, 1992; Miller et al., 1978; Porcella, 1970) nebo na pevném agarovém médiu z přírodního vzorku (Lukavský, 1983). Testy toxicity s *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) dosahují velké citlivosti při určování akutní toxicity. Nejvíce toxických efektů zachytil bakteriologický test Microtox (Maršálek et Rojíčková, 1995).

Koncepce limitace předpokládá, že existuje horní hranice specifické růstové rychlosti μ_{\max} a vytvořeného množství biomasy, obojí dosažitelné za podmínek, kdy všechny růstové faktory jsou v nadbytku. Za limitující lze pokládat každý faktor, jehož intenzita je nižší než je nutná pro dosažení maximální specifické růstové rychlosti a dosažitelného množství biomasy (Marvan et Přibil, 1976).

Před vlastním provedením biotestu je nutná standardizace metody, tzn. určení:

- a) standardních podmínek, za jakých bude biotest probíhat (teplota, světelné podmínky a výživa řas);
- b) reakcí organismu směrodatných pro kvantitativní hodnocení testu; především redukce růstu nebo růstové rychlosti o 50%, případně snížení rychlosti produkce kyslíku o určité procento v porovnání s kontrolou (Forsberg et Forsberg, 1972; Marvan, 1976; Marvan et Sládečková, 1978).

Pěstováním řas v těchto předem určených optimálních podmínkách zjistíme maximální dosažitelnou rychlost růstu a množství biomasy. Provedením biotestu za přítomnosti známých koncentrací herbicidu zjistíme citlivost metody detekce. Koncentrace testované látky, v tomto případě herbicidu, by měla být taková, abychom mohli pozorovat několik hladin inhibice růstu (10 - 90 %). Na tomto principu je založena řada užívaných řasových testů s menšími modifikacemi (Miller et al, 1978; Porcella, 1970).

1.1.1. Biotesty ISO 8692 a ISO 10253

Mezinárodní Organizace pro Standardy (ISO, International Organization for Standardization) vydává normy sjednocující metodiku biotestů, včetně řasových. Mezi nejčastěji používané metody v našich podmínkách patří růstový inhibiční test ISO 8692

(1987) s testující řasou *Raphidocelis subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*). Používá se pro snadno rozpustné chemické sloučeniny, které nejsou významně rozkládány v průběhu testu. Dalším testem, navrženým v České republice je TNV 757741 (technická norma vodního hospodářství) Ministerstva zemědělství České republiky (Lukavský, Maršálek et Fremrová, 1995). Oba výše uvedené testy jsou určeny pro sladké vody.

Standardizaci biotestu pro mořskou vodu vydala ISO v roce 1995, pod číslem ISO 10253. Tento test byl vypracován s použitím mořské rozsivky *Skeletonema costatum* a *Phaeodactylum tricornutum*. Tyto rozsivky jsou důležité a široce rozšířené planktonní organismy vyskytující se zejména v ústích řek a v pobřežních oblastech. ISO 10253 specifikuje metodu na determinaci toxického efektu chemických sloučenin na růst těchto rozsivek (celé znění normy v originále je obsaženo v příloze). Používá se pro testování substancí, které nejsou velkou měrou degradovány nebo eliminovány v průběhu testu. Normu na testování špatně rozpustných, těkavých látek, kovů a znečištěných vod vydala ISO roku 1998 pod číslem ISO 14442.

Oproti nesporným výhodám biotestu se staví i některé jeho nevýhody. Je to zejména pěstování velkoobjemových kultur a dlouhá doba kultivace (Kubín, 1994). Vzhledem k této dlouhotrvající kultivaci předpokládáme snižující se poměr (testovaná látka : řasová biomasa) a možnou adaptaci řas na přítomnost herbicidu a selekci rezistentních buněk.

Abych stanovila vliv adaptace a selekce na výsledky biotestů, srovnala jsem akutní inhibici fotosyntézy herbicidem s chronickým působením herbicidu v růstového inhibičním testu. Závislost fotosyntetické aktivity měřené vývojem kyslíku a fluorescenční emisí na koncentraci herbicidu byla provedena ihned po přidání herbicidu k suspenzi rozsivek kdy je vliv adaptace či selekce vyloučen. Naproti tomu v řasovém biotestu byla kultura rozsivek vystavena působení herbicidu po mnoho generací a lze tedy očekávat, že došlo ke snížení citlivosti kultury k herbicidu adaptací a selekcí.

K vysvětlení principů měření fotosyntetických charakteristik považuji za nezbytné zavést základní pojmy používané k popisu práce fotosyntetického aparátu a k popisu informací získávaných fluorescenčními měřeními.

1.2. Fotosyntéza

V eukaryotních buňkách řas a vyšších rostlin se fotosyntéza odehrává ve specializovaných organelách, chloroplastech. Tyto organely sestávají z vnějších obalových

membrán a z komplexu thylakoidních membrán specializovaných na přeměnu energie. Kapalná fáze vně thylakoidu se nazývá stroma a kapalná fáze uvnitř thylakoidu lumen.

V thylakoidní membráně probíhá první část fotosyntézy, při níž se energie fotonů využívá k přenosu elektronů a protonů. Tím se jednak redukuje NADP na NADPH + H⁺, jednak vytvoří rozdíl elektrochemických potenciálů vně a uvnitř thylakoidní membrány. Rozdílu elektrochemických potenciálů se prvotně využívá k syntéze ATP.

V plazmatickém oddělení chloroplastu (stromatu) se nacházejí enzymy Calvinova cyklu, které katalyzují reakce, v kterých se CO₂ (oxidovaná forma uhlíku) mění na redukovanou formu (uhlík vázaný v organických sloučeninách).

V následujícím textu se budu zabývat pouze komplexy vázanými v thylakoidní membráně. Zde dochází k dějům, které jsou přímo závislé na absorpci světla.

Thylakoidní membrány všech organismů s oxygenní fotosyntézou obsahují čtyři komplexy ukotvené v membráně: fotosystém II (PSII), fotosystém I (PSI), cytochrom bf a ATP-synthasu (APT-ázu) a dva pohyblivé přenašeče elektronů: plastochinon a plastocyanin.

1.2.1. Reakční centrum fotosystému II

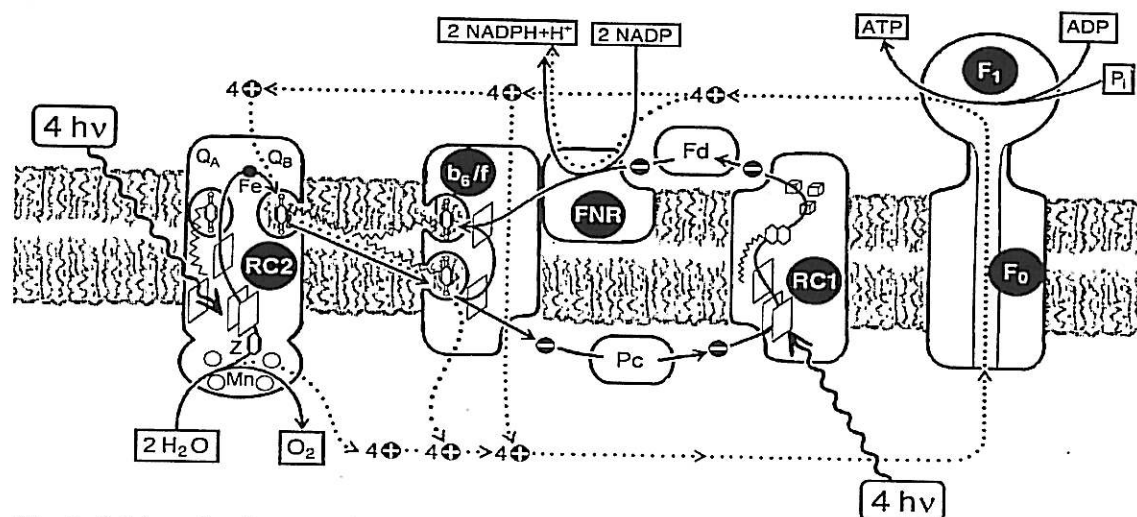
K vlastní fotochemické přeměně energie dochází v reakčních centrech. Excitační energie, kterou získá chlorofyl pohlcením fotonu je použita ke stabilnímu rozdělení nábojů. V membráně oxygenní fotosyntézy jsou dva typy reakčních center (RC), označovaná jako reakční centrum fotosystému II (PSIIRC) a reakční centrum fotosystému I (PSIRRC).

Prostetické skupiny nesou dva polypeptidy, D1 a D2. Primárním donorem je dimer chlorofylových molekul (speciální pár, označuje se P680), přechodným akceptorem je feofytin. Primárním a sekundárním akceptorem jsou chinony Q_A a Q_B. S reakčním centrem jsou pevně vázány OEC (viz dále) a dva chlorofyl proteiny, které tvoří vnitřní anténu. Součástí PSIIRC je také vnější anténa sestávající z pohyblivého světlosběrného komplexu a ze spojovacích anténních chlorofyl proteinů fotosystému II. Elektron z excitovaného P680* přejde přes chlorofyl a feofytin na Q_A, odtud na Q_B.

1.2.2. Přeměny energie v thylakoidní membráně

Řetězec fotosyntetického přenosu elektronů sestává z bílkovinných komplexů zasazených v membráně a z pohyblivých přenašečů elektronů mezi bílkovinami zakotvenými v membráně (**Obr. 1.**).

V PSIIRC vede rozdělení nábojů k oxidaci primárního donoru P680 a k redukci feofytinu a posléze pevně vázaného chinonu Q_A . Ten předává elektron na další chinon (Q_B), který z plastochinonového poolu v membráně vstoupí do kapsy Q_B , a tam se na fotosystém II naváže. Na úplnou redukci chinonu Q_B jsou potřeba dva elektrony, tedy dva fotoakty. K dvěma elektronům se před odpojením z vazebného místa připojí dva protony ze stromatální strany membrány a vznikne molekula neutrálního plastochinolu.



Obr. 1: Schéma přeměny energie v thylakoidní membráně oxygenní fotosyntézy. Převzato z Šetlík, 1997.

Oxidovaný $P680^+$ je redukován elektronem pocházejícím z komplexu oxidujícího vodu a uvolňujícího kyslík (OEC; oxygen evolving complex). OEC se přimyká těsně k PSIIRC na povrchu membrány hraničícím s dutinou thylakoidu. Úkolem OEC je postupně shromáždit čtyři oxidační ekvivalenty a těmi zoxidovat dvě molekuly vody, takže vznikne jedna molekula kyslíku.

Redukovaný chinon přenese vodíky (elektrony a protony) od akceptorové strany PSIIRC do cytochrom b_6/f komplexu. Ten protony a elektrony opět oddělí; protony vyloučí dovnitř thylakoidu. Elektrony přijme plastocyanin (PC), který je dopraví k PSIRC.

Elektron přenášený plastocyaninem redukuje primární donor $P700^+$ reakčního centra prvního fotosystému, který byl před tím oxidován další primární separací náboje. Lineární přenos elektronu od vody přes oba fotosystémy je zakončen v thylakoidní membráně redukcí feredoxinu, který dále slouží k redukci NADP a dalších složek temnotních reakcí fotosyntézy.

Pro rozložení dvou molekul vody (= uvolnění jedné molekuly kyslíku), asimilaci jedné molekuly CO_2 Calvinovým cyklem se musí celým řetězcem přenést nejméně čtyři

elektrony, to znamená, že je potřeba osmi fotonů, které byly pohlceny fotosyntetickou anténou a využity k rozdělení náboje v PSIIRC a PSIRC.

1.3. Fluorescenční emise

Jak je uvedeno výše, energie fotonů zachycených fotosyntetickými membránami se přeměňuje na energii chemickou. Tato přeměna se neobejde bez termodynamicky nevyhnutelných ztrát. Část těchto energetických ztrát je vyzářena zpět v podobě fluorescence.

Když se buňky fotosyntetického organismu osvětlí po delším pobytu ve tmě, intenzita fluorescence rychle výrazně stoupne (v čase kratším než 1s) do ostrého maxima a následně klesá na nižší hodnotu. Časové změny fluorescence odrážejí proměnlivost kvantového výtěžku fotosyntetických procesů a tedy i s nimi spojených ztrát krátce po přechodu ze tmy na světlo. Tento jev popsal poprvé Müller roku 1874 a nazývá se fluorescenční indukci. Soustavným měřením se zabýval až Kautsky v letech 1931-1943. Ten zjistil, že čím větší podíl pohlceného záření se mění v chemickou energii (čím je přenos elektronů efektivnější), tím nižší je intenzita fluorescence chlorofylu a naopak.

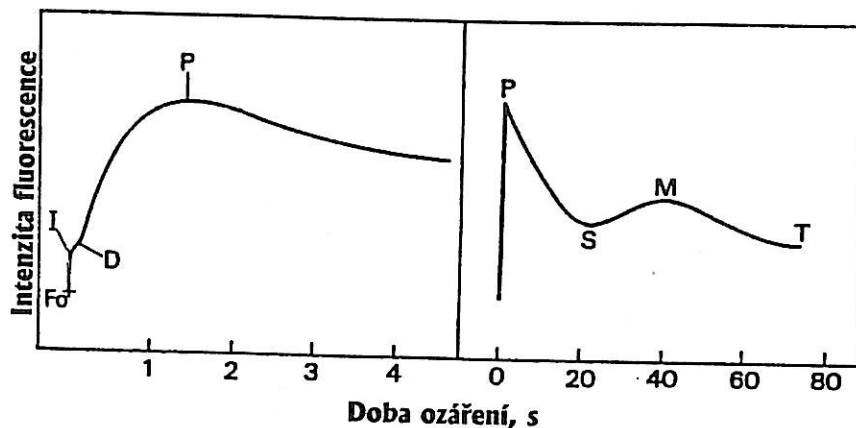
Duysens et al. (1963) vyslovil hypotézu vysvětlující přechodné jevy, která, jak se později ukázalo, byla správná. Reakční centrum (RC) může být ve dvou stavech: a) RC je otevřené, když může uskutečnit fotochemické rozdělení nábojů. V tomto případě je malá pravděpodobnost vyzáření fluorescence, říká se, že takové centrum zhasí fluorescenci. b) RC je zavřené, když není schopno využít excitační energii k rozdělení nábojů. Pak je vysoká pravděpodobnost vyzáření nevyužité energie v podobě fluorescence.

Jsou-li všechna centra zavřené, naměříme maximální fluorescenci (F_m). Pokud jsou všechna centra otevřená, naměříme minimální fluorescenci (F_o). Rozdíl $F_m - F_o$ se nazývá variabilní fluorescence, F_v . Otevřená centra jsou taková, v nichž je první chinonový akceptor elektronů Q_A v oxidovaném stavu, schopném přijímat elektrony. Zavřená centra mají primární akceptor redukovaný. Vedle redoxního stavu Q_A jsou i další faktory, které ovlivňují fluorescenční indukci.

Na **Obr. 2** je charakteristická indukční křivka ve dvou různých časových měřících.

Přechod $F_o \rightarrow F_I$ odráží redukci Q_A v tzv. neaktivních PSIIRC. Zde je přenos elektronu z Q_A na Q_B ochromen. Tato RC se zavírají již při prvním přenosu elektronu na Q_A . V těchto centrech je Q_A^- reoxidován až o tři řády pomaleji (stovky milisekund) než v aktivních PIIRC.

RC, u nichž je odtok elektronů neporušen, se uzavírají postupně, jak se redukuje pool plastochinonových molekul v membráně. Přechod $F_I \rightarrow F_P$ odráží toto postupné zavírání PSIIRC.



Obr. 2: Průběh intenzity fluorescence v čase u vzorku adaptovaného na tmu. Znáznomena je rychlá (vlevo) a pomalá (vpravo) kinetika. Převzato z Walker, 1987.

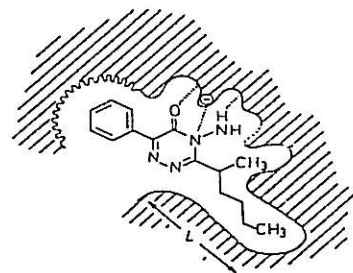
Hodnoty F_m lze dosáhnout při vysokých ozářeních. Při středních ozářeních dosáhneme F_m jen, zabráníme-li reoxidaci PQH_2 nebo zabráníme-li toku elektronů z Q_A^- na Q_B například herbicidem.

Z hodnoty F_m fluorescence za fyziologických podmínek klesá, až se ustálí na nějaké nižší hodnotě. Tento pokles je způsoben tzv. nefotochemickým zhašením, které je zapříčiněno jinak než reoxidací redukovaného Q_A .

1.3.1. Herbicidy a fluorescenční indukce

Po přidání DCMU jsou PSIIRC blokována vazbou herbicidu v Q_B kapse (Obr.3) (Duysens et Sweers, 1963; Good, 1961; Izawa, 1977). Q_A akceptor tedy může být dlouhodobě zredukován jediným rozdělením náboje v reakčním centru. Proto je fluorescenční indukce v přítomnosti DCMU mnohem rychlejší než v nepřítomnosti herbicidu, kdy je nárůst $F_I \rightarrow F_P$ dosaženo mnohonásobným rozdělením náboje (Obr.4).

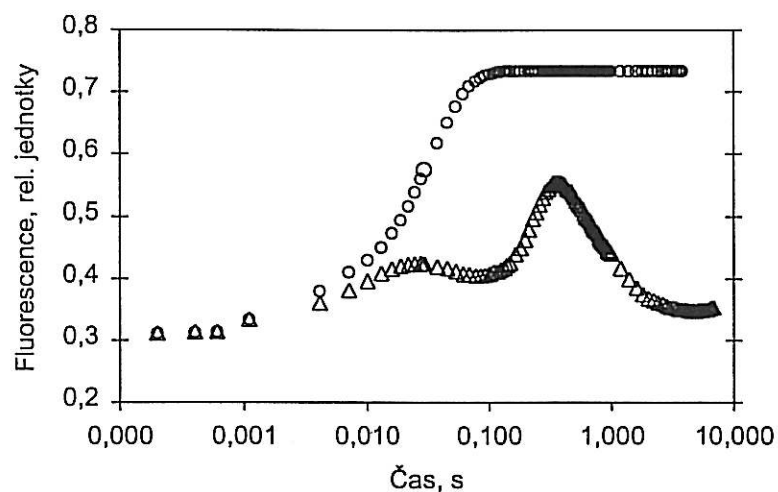
V přítomnosti DCMU má fluorescenční indukce obvykle rychlou a pomalu komponentu. Nárůst je mírně sigmoidální. Je to způsobeno velikostní heterogenitou antény PSII. Ta RC,



Obr. 3: Vazba herbicidu DCMU v Q_B kapse. Převzato z Draber et al., 1991.

k nimž je připojena větší anténa, mají větší pravděpodobnost zachycení fotonu, proto přecházejí rychleji do uzavřeného stavu nežli RC s připojenou malou anténou. Mezi PSII RC existují také propojení. Antény několika PSII jsou tak propojeny, že si snadno předávají excitaci. Exciton vzniklý v jedné z nich se může dostat do některého sousedního RC, je-li jeho RC uzavřené. Proto má zpočátku každý zachycený exciton větší pravděpodobnost dosáhnout otevřeného RC a to způsobuje sigmoidicitu indukční křivky. Indukční křivka fluorescence za fyziologických podmínek tedy vypovídá o funkční heterogenitě PSII (aktivní a neaktivní RC). V přítomnosti DCMU vypovídá o strukturní heterogenitě PSII (velikost antén a jejich propojení).

Podklady pro popis základních principů fotosyntézy a fluorescence jsem převzala z různých zdrojů (Krause et Weis, 1991; Šetlík, 1997; Vermaas, 1984).



Obr. 4: Fluorescenční indukce v přítomnosti -O- a v nepřítomnosti DCMU -Δ-.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této magisterské práce je určit citlivost růstového inhibičního testu ISO10253 na přítomnost DCMU v mořské vodě a zjistit, čím je tato citlivost omezena.

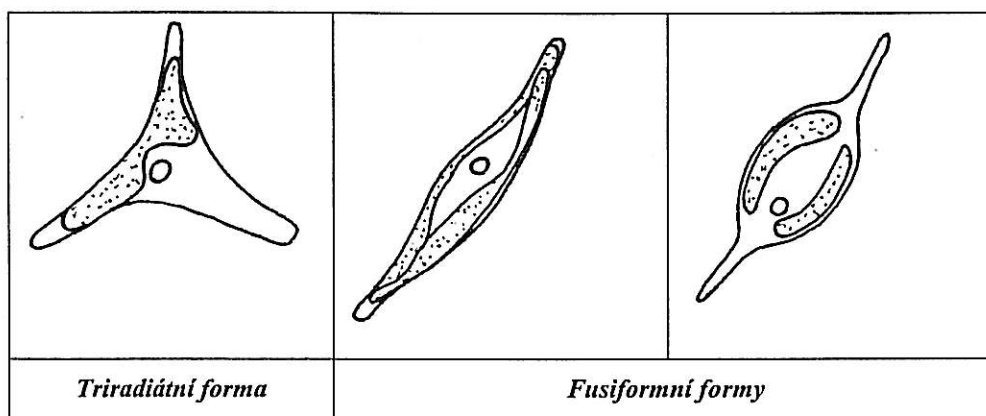
Dále chci srovnat biotest s metodami přímých měření fotosyntetických parametrů, jako je měření fotosyntetického vývoje kyslíku a fluorescence. V těchto pokusech chci také stanovit hodnotu zdánlivé disociační konstanty a koncentraci reakčních center rozsivky *Phaeodactylum tricornutum*.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Organismus

Pracovala jsem s rozsivkou *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN, kmen COUGH, poskytnutou z Provazoli – Guillard National Center of Marine Phytoplankton (CCMP), Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, West Boothbay Harbor, Maine 04575 USA.

Phaeodactylum tricornutum je jednobuněčná mořská planktonní rozsivka z řádu *Pennales*. Buňky mají jeden nástěnný chloroplast. Vyskytuje se ve třech formách: triradiální, fusiformní a oválné (Obr. 5), které se liší svým výskytem.



Obr. 5: Pozorované formy rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* v suspenzi. Kultivační teplota 18 °C, ozáření bílým světlem 100 E.m².s⁻¹. Suspenze byla aerována vzduchem

Lewin (1958) předpokládal, že oválná forma *Phaeodactylum tricornutum* je bentická, zatímco triradiální a fusiformní forma jsou planktonní typy. V suspenzních kulturách *Phaeodactylum tricornutum* jsou přítomny výhradně triradiální a fusiformní formy buněk. Oválná forma byla v suspenzi pozorována pouze na stěnách kultivační baňky, kde probublávání vzduchem nebylo dostačující (Round et al., 1990).

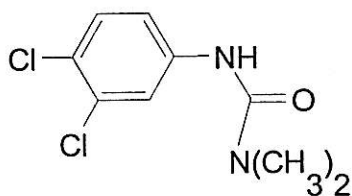
Křemičité schránky triradiální a fusiformní formy buněk pokrývá ještě organická vrstva, která je tvořena polymery xylosy, mannosy, fukosy a galaktosy (Lewin, 1958). Tato vrstva se objevuje u oválné formy pouze na jedné valvě.

Tato rozsivka byla napěstována ve vodou chlazeném válci o vnitřním průměru 50mm a objemu 1000ml v syntetické mořské vodě připravené podle ISO 10253. Intenzita fotosynteticky aktivního záření byla 60 μE.m⁻².s⁻¹, kultivační teplota 19 °C. Kultura byla probublávána vzduchem.

3.2. Herbicid

Ve své práci jsem použila jeden z derivátů močoviny, diuron. Z hlediska mechanismu působení patří mezi nejlépe prozkoumané herbicidy.

Vysoce čistý diuron (3- [3,4- dichlorfenyl]- 1,1- dimethyl- močovina; DCMU) byl zakoupen od firmy Riedel – de Haën (Seelze, Německo). Jeho molekulová hmotnost je 233,10. Strukturální vzorec je na **Obr. 6**.



Obr. 6: Strukturální vzorec DCMU.

Ze zásobního roztoku $1 \cdot 10^{-2}$ M DCMU v ethanolu byly naředěny tři roztoky o koncentracích $2 \cdot 10^{-3}$, $6 \cdot 10^{-5}$ a $2 \cdot 10^{-6}$ M, které se používaly na přípravu konečných testovaných koncentrací herbicidu ve vzorcích. Z těchto roztoků byly připravovány testované koncentrace DCMU v kultivačním mediu, které byly vybrány tak, aby

poskytovaly na logaritmické ose zhruba ekvidistantní odstupy s 1 až 4 měřeními na dekádu: 0; 0,1; 1; 3; 10; 18; 30; 56; 100; 300; 1000 nM

Každá koncentrace byla použita pro dvě nezávislá opakování. Konečné koncentrace rozpouštědla v mediu byly 0,5 % pro měření fotosyntetického vývoje kyslíku a fluorescence, 0,1 % pro růstový biotest.

3.3. Biotest ISO 10253

3.3.1 Kultivační médium

Syntetická mořská voda byla připravována podle návodu v ISO 10253 s přidávkou živných roztoků č. 1 – 3 (**Tab. 1, 2**). Použité chemikálie byly čistoty p.a.

Tab. 1

Soli	[g/l]
NaCl	22
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄ (bezvodý)	3,7
CaCl ₂ (bezvodý)	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
Sole H ₃ BO ₃	0,023

Pro přípravu kultivačního média jsem přidala 15 ml živného roztoku č.1, 0,5 ml č. 2 a 1 ml č.3 do 900 ml syntetické mořské vody a doplnila do 1000 ml.

Zásobní roztoky živin č.1 a č.3 byly autoklávovány, zásobní roztok č.2 a roztok NaHCO₃ byly filtrovány přes jednorázový sterilní membránový filtr (Sartorius Minisart, SM 17597, 0,2µm A), aby vystavením vysoké teplotě vitamíny obsažené v roztoku č. 2 nebyly degradovány a NaHCO₃ se nevysrážel.

3.3.2. Inokulace

Inokulum pocházelo z předpěstované kultury, která byla v exponenciální fázi růstu. Předpěstování trvalo tři dny. Počáteční hustota buněk ve vzorku byla 10^4 buněk.

3.3.3 Inkubace

Kultury o objemu 100 ml byly pěstovány v 250 ml Erlenmeyerových baňkách na chlazeném kovovém bloku o rozměrech 1,2 x 0,6 m, na němž byly rozestaveny do dvou řad (Obr. 7). Pro zlepšení vedení tepla stály baňky v tenké vrstvě vody. Temperovaný blok

tvořila kovová deska, v níž byla umístěna chladicí kovová trubka spojená s kryostatem.

Kultivační teplota byla udržována na 20 ± 1 °C. Intenzitu dopadajícího fotosynteticky aktivního záření $100 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ (měřeno přístrojem Li – COR, model LI –189, Lincoln, NE, USA) zajistily čtyři zářivkové trubice (Tungsram F 33, 36 W, Hungary), které osvětlovaly baňky z obou stran. Kultury řas byly nejméně pětkrát denně ručně intenzivně promíchány. Při každém míchání jsem jednotlivé baňky přemísťovala, aby bylo dosaženo homogenních kultivačních podmínek pro všechny kultury. Kultivace trvala nejvíce 20 dnů.

Tab. 2

Živiny	Koncentrace v zásobním roztoku	Koncentrace v testovaném roztoku
Roztok č. 1		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	48 mg/l	149 $\mu\text{g}/\text{l}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	144 mg/l	605 $\mu\text{g}/\text{l}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	45 mg/l	150 $\mu\text{g}/\text{l}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,157 mg/l	0,6 $\mu\text{g}/\text{l}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,404 mg/l	1,5 $\mu\text{g}/\text{l}$
H_3BO_3	1140 mg/l	17,1 $\mu\text{g}/\text{l}$
Na_2EDTA	1000 mg/l	15,0 $\mu\text{g}/\text{l}$
Roztok č. 2		
Thiamin hydrochlorid	50 mg/l	25 $\mu\text{g}/\text{l}$
Biotin	0,01 mg/l	0,005 $\mu\text{g}/\text{l}$
B_{12}	0,10 mg/l	0,05 $\mu\text{g}/\text{l}$
Roztok č. 3		
K_3PO_4	3,0 g/l	3,0 mg/l
NaNO_3	50,0 g/l	50,0 mg/l
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	14,9 g/l	14,9 mg/l

3.3.4. Měření přírůstku biomasy

Přírůstek biomasy buněk byl hodnocen hustotou buněk a optickou hustotou při 750 nm. Optická hustota (optical density; OD 750 nm) je nedestruktivní metodou stanovování růstu (Doucha et Kubín, 1975). Optická hustota suspenze byla proměřována ihned po inokulaci, dále čtvrtý, pátý, šestý, sedmý, devátý, jedenáctý a dvacátý den inkubace. Na měření byl odebírán 1ml řasové suspenze a proměřován při 750 nm na spektrofotometru (SPEKOL EK1, Carl Zeiss Jena, D) v 0,5 cm skleněných kyvetách. Vlnová délka 750 nm je spolehlivě mimo oblast absorpce chlorofylu i jiných fotosyntetických barviv, takže měříme pouze světlo rozptýlené na buňkách.

Vzorky na počítání hustoty buněk byly odebírány z kultur druhý, třetí, pátý, šestý, a devátý den po inokulaci. Odebírán byl vždy 1ml vzorku. Rozsivky byly fixovány Lugolovým roztokem v poměru 1ml řasové suspenze : 200 μ l Lugolu. Hustota buněk byla počítána v Bürkerově komůrce tak, aby celkový počet buněk byl minimálně tři sta.

3.3.5. Vyhodnocování inhibice růstu

Naměřená data jsem vyhodnocovala předepsaným postupem v ISO 10253:

Procentuální inhibice růstu byla založena na výpočtu plochy pod růstovou křivkou a růstové rychlosti. Oba dva výpočty se týkaly pouze periody do konce exponenciálního růstu v kontrolních kulturách bez DCMU.

Plocha pod růstovou křivkou (integrál biomasy, A) byl vypočítán podle vzorce:

$$A = \frac{t_1(N_1 - N_0)}{2} + \frac{(t_2 - t_1)(N_1 + N_2 - 2N_0)}{2} + \dots + \frac{(t_n - t_{n-1})(N_{n-1} + N_n - 2N_0)}{2} \quad (14)$$

kde:

t_1 - čas v hodinách mezi prvním měřením a začátkem testu

t_2 - čas v hodinách mezi druhým měřením a začátkem testu

t_{n-1} - čas v hodinách mezi (n-1) měřením a začátkem testu

t_n - čas v hodinách mezi n-tým měřením a začátkem testu

N_0 - počáteční (inokulační) hustota buněk

N_1 - naměřená hustota buněk v čase t_1

N_2 - naměřená hustota buněk v čase t_2

N_{n-1} - naměřená hustota buněk v čase t_{n-1}

N_n - naměřená hustota buněk v čase t_n

Pro kontrolu a každou testovanou koncentraci DCMU byla vypočítána průměrná hodnota A. Procentuální inhibici jsem spočítala z průměrných hodnot A podle vzorce:

$$I_{Ai} = \frac{\bar{A}_c - \bar{A}_i}{\bar{A}_c} * 100 \quad (15)$$

kde:

I_{Ai} - inhibice v procentech pro testovanou koncentraci i

A_i - průměrná plocha pro koncentraci i

A_c - průměrná plocha pro kontrolu

Já jsem vyhodnocovala růst kultury raději pomocí růstové rychlosti, která má, na rozdíl od plochy pod růstovou křivkou, snadno interpretovatelný význam a především nezávisí na volbě délky vybrané exponenciální fáze růstu. Růstová rychlost, μ , byla vypočítána pro každou kulturu ze vzorce:

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L} \quad (16)$$

kde:

t_L - čas v hodinách mezi posledním měřením v periodě exponenciálního růstu a začátkem testu

N_0 - počáteční hustota buněk

N_L - hustota buněk naměřená v čase t_L

Inhibice růstu byla spočtena z průměrných hodnot růstových rychlostí ve všech testovaných koncentracích DCMU a kontrolách podle vzorce:

$$I_{\mu i} = \frac{\bar{\mu}_c - \bar{\mu}_i}{\bar{\mu}_c} * 100 \quad (17)$$

Pro kontrolu a každou testovanou koncentraci DCMU byla vypočítána průměrná hodnota A. Procentuální inhibici jsem spočítala z průměrných hodnot A podle vzorce:

$$I_{Ai} = \frac{\bar{A}_c - \bar{A}_i}{\bar{A}_c} * 100 \quad (15)$$

kde:

I_{Ai} - inhibice v procentech pro testovanou koncentraci i

A_i - průměrná plocha pro koncentraci i

A_c - průměrná plocha pro kontrolu

Já jsem vyhodnocovala růst kultury raději pomocí růstové rychlosti, která má, na rozdíl od plochy pod růstovou křivkou, snadno interpretovatelný význam a především nezávisí na volbě délky vybrané exponenciální fáze růstu. Růstová rychlost, μ , byla vypočítána pro každou kulturu ze vzorce:

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L} \quad (16)$$

kde:

t_L - čas v hodinách mezi posledním měřením v periodě exponenciálního růstu a začátkem testu

N_0 - počáteční hustota buněk

N_L - hustota buněk naměřená v čase t_L

Inhibice růstu byla spočtena z průměrných hodnot růstových rychlostí ve všech testovaných koncentracích DCMU a kontrolách podle vzorce:

$$I_{\mu i} = \frac{\bar{\mu}_c - \bar{\mu}_i}{\bar{\mu}_c} * 100 \quad (17)$$

kde:

$I_{\mu i}$ - inhibice růstové rychlosti v procentech pro testovanou koncentraci i

μ_i - průměrná růstová rychlost pro testovanou koncentraci i

μ_c - průměrná růstová rychlost pro kontrolu

3.3.6. Stanovení koncentrace chlorofylu

Pro stanovení koncentrace chlorofylu (a+c) v buňkách jsem použila metodu extrakce pigmentů do 90% acetonu s proměřováním absorbance při vlnových délkách 720nm, 664nm a 630nm v dvoupraskovém spektrofotometru (Shimadzu UV2000). Hodnota absorbance v 720nm byla odečítána od absorbancí v 664nm a 630nm.

Koncentrace chlorofylu (a+c) byla počítána podle vzorců (Humprey, 1979; Jeffrey and Humprey, 1975):

$$\text{Chl(a)} = 11,47 * E_{664} - 0,40 * E_{630} \quad (18)$$

$$\text{Chl}(c_1+c_2) = 24,36 * E_{630} - 3,73 * E_{664} \quad (19)$$

Vzorce (18 – 19) udávají koncentrace v mg/l. Při započtení molekulární hmotnosti Chla = 893,5 g /mol a průměrné molekulární hmotnosti Chl(c1+c2) = 610 g/mol je možné tvar těchto vzorců upravit tak, aby poskytovaly informaci o molárních koncentracích:

$$\text{Chl(a)} = 1000 * (11,47 * E_{664} - 0,40 * E_{630}) / 893,5 \quad (\mu\text{M}) \quad (20)$$

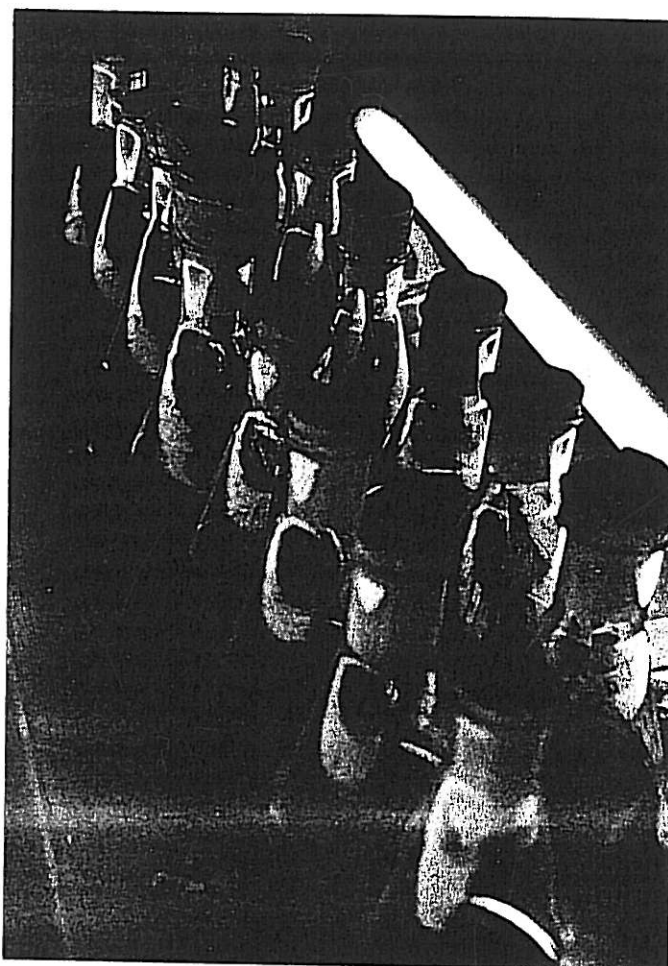
$$\text{Chl}(c_1+c_2) = 1000 * (24,36 * E_{630} - 3,73 * E_{664}) / 610 \quad (\mu\text{M}) \quad (21)$$

Ukázka koncentrační řady chlorofylu u suspenze rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* je na **Obr. 8**.

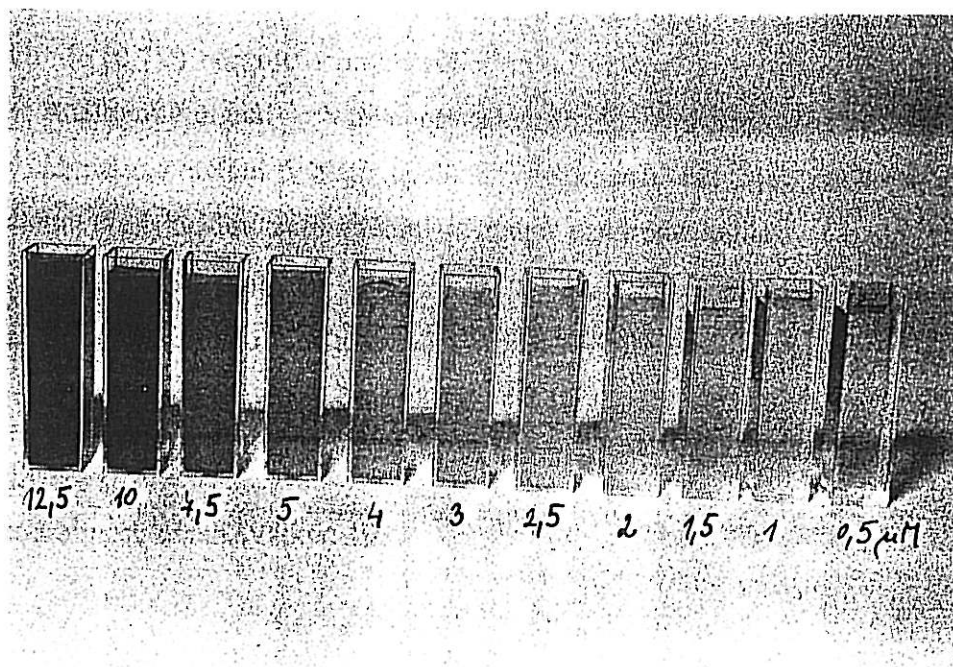
3.3.7. Světelná mikroskopie

Počítání a optickou kontrolu kultur jsem prováděla na světelném mikroskopu Docuval (Carl Zeiss, Jena, D) osazený fázovým a interferenčním kontrastem a GF - planapochromatickými objektivy.

Obr. 7: Kultivace biotestu

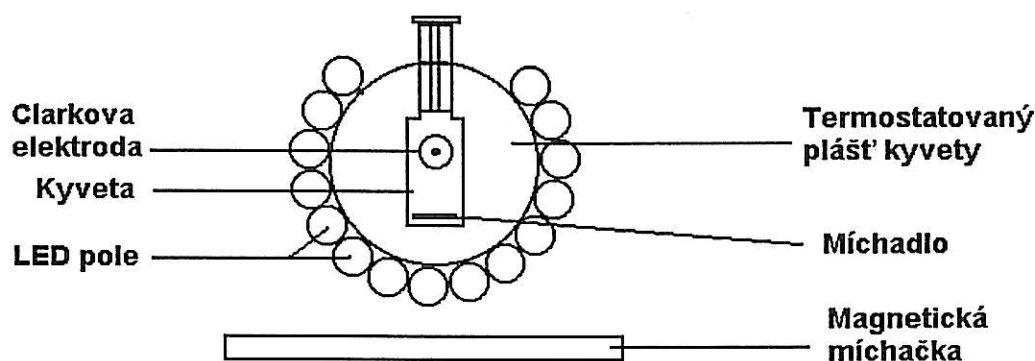


Obr. 8: Koncentrační řada chlorofylu řasy *Phaeodactylum tricornerutum*



3.4. Měření fotosyntetického vývoje kyslíku

Fotosyntetický vývoj kyslíku jsem měřila v termostátované kyvetě (Gilson Medical Electronics, Middleton WI, USA) o objemu 2 ml osvětlené z obou stran polem červených světlo emitujících diod (Hewlet-Packard HLMP 8104, USA), celkově 26 diod. Teplota v průběhu měření byla 19 °C. Schéma zařízení je na **Obr. 9**.



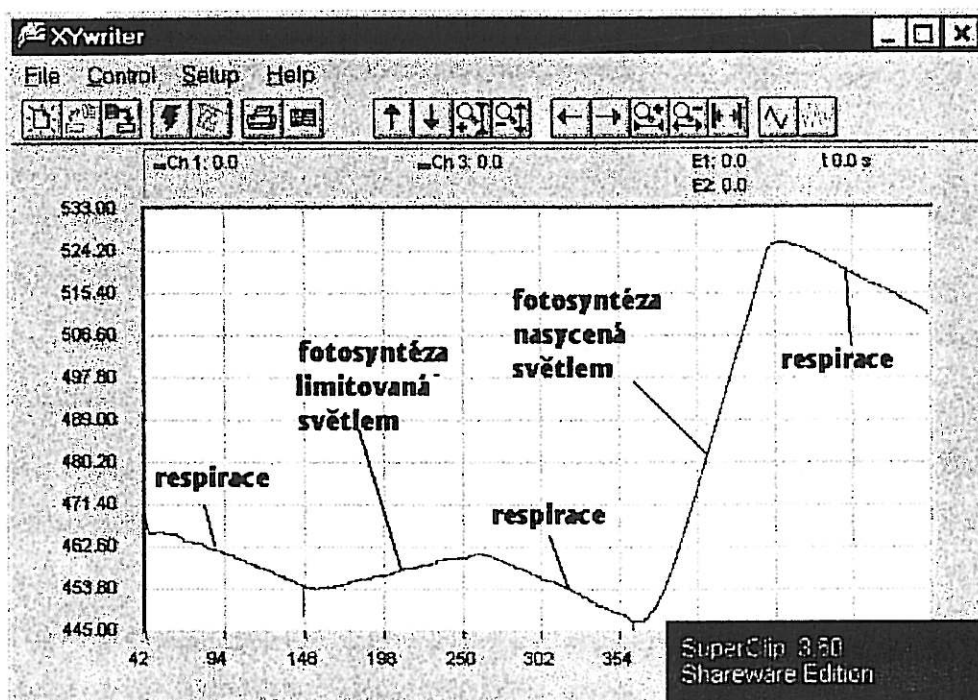
Obr. 9: Schéma zařízení pro měření fotosyntetického vývoje kyslíku. Popis je v textu.

Koncentraci kyslíku v kyvetě jsem měřila Clarkovou elektrodou (YSI/5331 Oxygen Probe, Yellow Spring, OH, USA) spojenou s digitálním zapisovačem XY – writer (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika).

Clarkova elektroda se skládá z platinové a stříbrné elektrody, které jsou obklopeny 10 mM roztokem KCl a od fotosynteticky aktivního vzorku jsou odděleny teflonovou membránou (YSI MODEL 5793, YSI Inc., Yellow Spring, Ohio, USA). Konstantní napětí na elektrodě (0,7V) udržuje a procházející proud úměrný koncentraci kyslíku měří XY – writer. Analogový signál je v něm převáděn do digitální formy. **Obr. 10** demonstruje typický záznam z měření vývoje kyslíku. Suspenze řas byla míchána magnetickým míchadlem. Před každou sérií měření je nutné elektrodu kalibrovat na rovnovážný stav kyslíku ve vodě při teplotě 19 °C, který je 280 μM. Pro jiné teploty (t) lze rovnovážnou molární koncentraci rozpuštěného kyslíku spočítat přibližně podle vzorce:

$$[O_2] = 439,417 - 10905 \cdot t + (0,13238t)^2 \quad (\mu M) \quad (22)$$

Další podrobnosti uvádí Walker, 1987.



Obr. 10: Záznam měření fotosyntetického vývoje kyslíku Clarkovou elektrodou YSI/5331 programem Xywriter firmy PSI Brno, Česká republika

3.5. Měření Q_A reoxidace fluorescenční emisí

Dvoumodulační fluorimetr FL-100 firmy Photon Systems Instruments (Brno, Česká republika) jsme použili pro měření kinetiky reoxidace Q_A^- .

Fluorescence byla vyvolána neperiodickými měřicími záblesky, jejichž zdrojem bylo 7 oranžových LED (Hewlett-Packard HLMP DH08, USA). Intenzita a délka záblesků byla nastavena tak, aby záblesky excitovaly méně než 0,1 % PSIIRC na jeden záblesk. Zdrojem jednoobrátkových sytících záblesků bylo pole 96ti červených LED (Hewlett-Packard HLMP 8104, USA). Optickou část přístroje detailně popisuje Trtílek et al.(1997). Ve verzi použité v této práci jsou dvě symetrické LED jednotky.

Vzorky o objemu 1,6 ml byly před měřením adaptovány 10 min ve tmě a měřeny v 10×10 mm kyvetě.

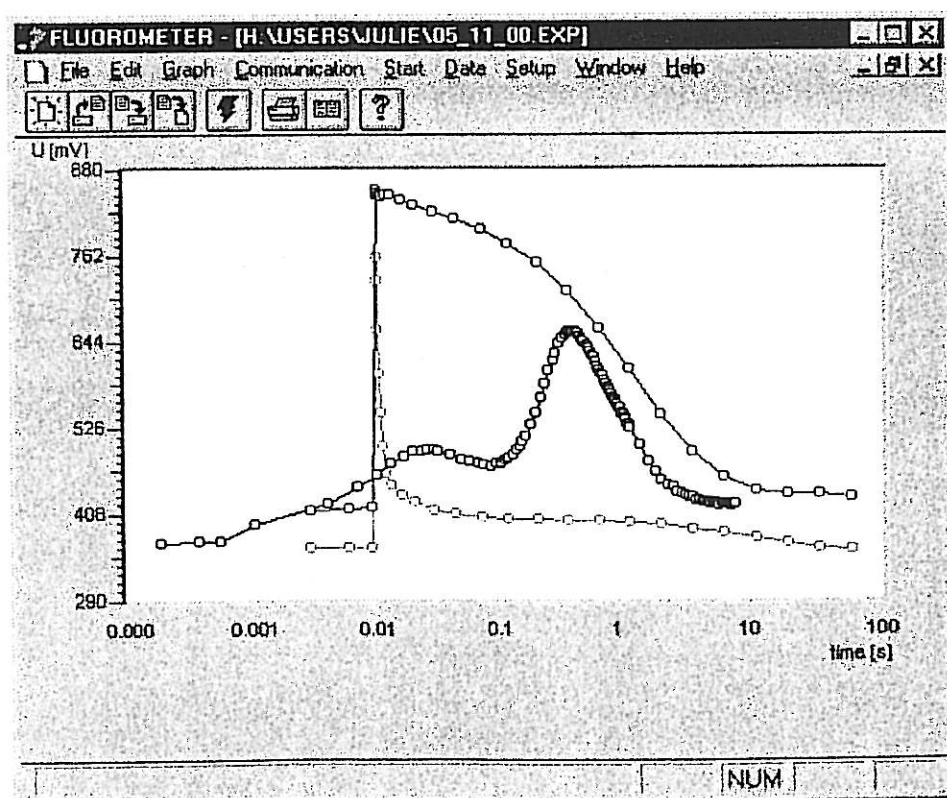
Po změření F_0 třemi měřicími záblesky následoval jednoobrátkový sytící záblesk (25 μ s, maximální výkon), který způsobil, že v každém RC došlo k právě jednomu primárnímu rozdělení náboje, po němž byl měřen pokles variabilní fluorescence odpovídající reoxidaci Q_A^- . První měření fluorescence bylo provedeno 50 μ s po záblesku a polední 56 s po sytícím záblesku. Měřicí body byly rozmístěny logaritmicky tak, že připadaly čtyři měření na

dekádu. Pokles indukované fluorescence po jednoobrátkovém saturační záblesku byl rozložen nelineární regresí na tři exponenciální komponenty:

- 1) rychlý pokles fluorescence (1 - 500 μ s), který odpovídá přenosu elektronů z Q_A na Q_B
- 2) pokles v milisekundové oblasti, který odráží přenos elektronů v částečně zredukovaném reakčním centru
- 3) pokles v oblasti sekund, který je spojen s rekombinací excitonu v neaktivním RC, které není schopno přenosu elektronu na plastochin.

Každý z těchto tří dějů je charakterizován rychlostní konstantou (k_1 , k_2 , k_3) a amplitudou (a_1 , a_2 , a_3). Inhibice fotosyntézy byla počítána z nárůstu třetí amplitudy (a_3), která odráží přítomnost reakčních center, jež jsou zablokována herbicidem a nemohou tedy dosáhnout reoxidace Q_A^- rychleji.

Pracovní okno programu FluorWin (PSI, Brno, Česká republika) obsluhující fluorimetr, který byl používán k měření Q_A^- reoxidací je na Obr. 11.



Obr. 11 Okno programu FluorWin v. 2.3 (PSI Brno, Česká republika). Zobrazena kinetika Q_A^- reoxidace bez DCMU (zelená), v přítomnosti DCMU (modrá) a ODP křivka (černá).

4. VÝSLEDKY METODICKÉ.

Experimenty byly zaměřeny na optimalizaci používaných metod a na vlastní vyšetření citlivosti roztavky *Phaeodactylum tricoratum* k herbicidu DCMU. Část výsledků je dosažena pomocí analýzy modelu vazby herbicidu na fotosystém II.

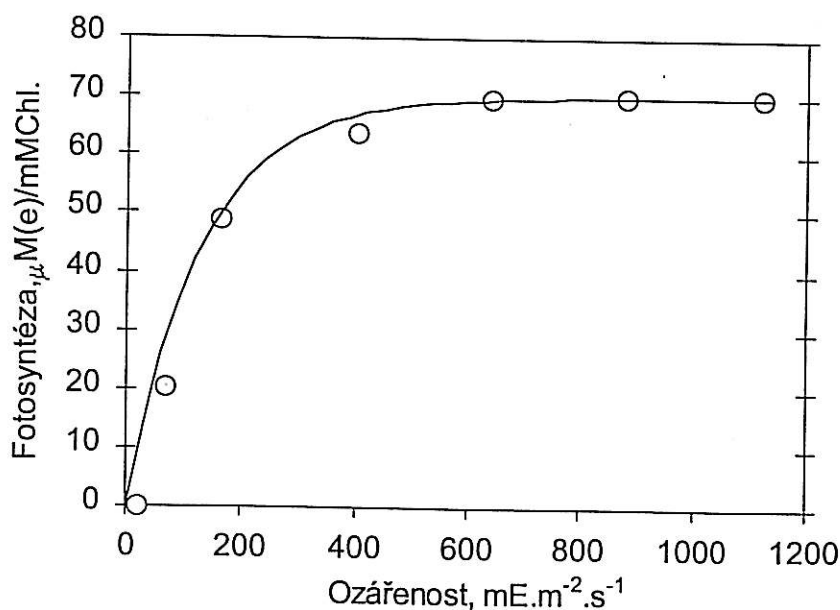
4.1. Experimentální výsledky

4.1.1. Světelná křivka

Ve standardu metody ISO 10253 je předepsána ozářenost v průběhu biotestu na 60 – 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Já jsem používala ozářenost 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Zajímalo mě, zda tato ozářenost dokáže fotosyntetické reakce v použitém organismu světlem nasytit nebo zda je to ozářenost fotosyntetické reakce limitující. Pokud by totiž šlo o sytící ozářenost, v níž jsou limitujícím prvkem temnotní reakce fotosyntézy, bylo by nutné očekávat, že biotest prováděný s touto ozářeností bude k přítomnosti herbicidu poměrně necitlivý.

Světelné křivky, tedy závislost rychlosti fotosyntetického vývoje kyslíku na ozářenosti jsem měřila pomocí Clarkovy elektrody.

Na Obr. 12 je znázorněna světelná křivka suspenze s koncentrací chlorofylu 3,8 μM . Saturujících účinků bylo dosaženo zhruba při ozářenosti 500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.



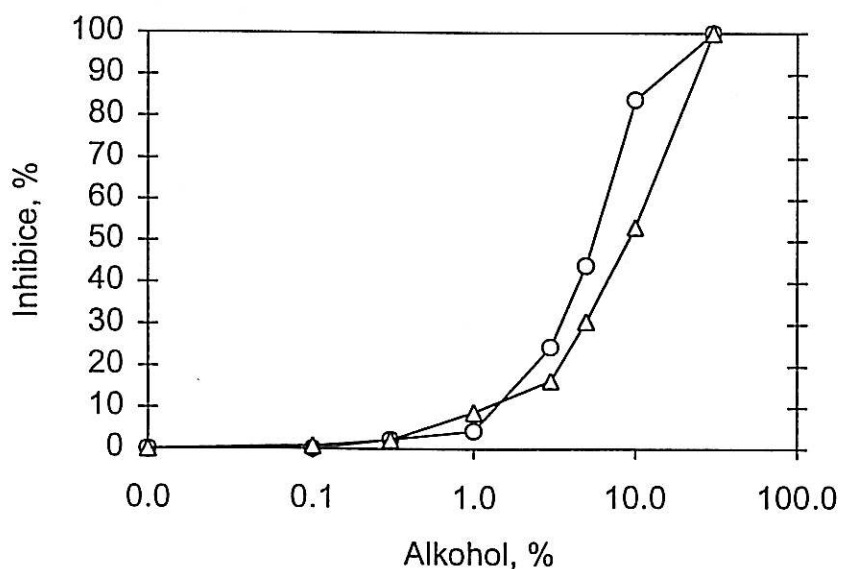
Obr. 12: Světelná křivka kultury *Phaeodactylum tricoratum* o koncentraci chlorofylu 3,8 μM měřená pomocí fotosyntetického vývoje kyslíku Clarkovou elektrodou YSI/5331. Teplota 19 °C.

Vzhledem k tomu, že kultury rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* dosahovaly za použitých podmínek kultivace maximálně koncentraci chlorofylu kolem 4 μM , lze předpokládat, že sytící ozáření je vždy blízko pod 500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Hodnota ozáření, při které probíhal biotest podle ISO 10253 (100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) je tedy hluboko pod touto úrovní, a nachází se přibližně v lineární fázi světelné křivky.

4.1.2. Vliv rozpouštědla na experimenty s herbicidy

Herbicidy jsou látky s omezenou rozpustností ve vodě. Z prakticky významných herbicidů lze uvést rozpustnost atrazinu (33mg/l) nebo simazinu (5mg/l) při 20 °C. Ani u diuronu nebylo možné použít zásobních roztoků ve vodě. Používali jsme buď ethanol nebo methanol. Samo rozpouštědlo však může mít na růst řas negativní vliv a může tak ovlivnit výsledek biotestu (Jay, 1996). Proto jsem vyšetřila alespoň okamžitý účinek těchto dvou alkoholů na fotosyntetický vývoj kyslíku. **Obr. 13** ukazuje, že až do koncentrace 0.1% neměla rozpouštědla na vývoj kyslíku znatelný vliv. U koncentrace kolem 1% se však začíná projevovat několikaprocentní inhibice. Ve vyšších koncentracích měl ethanol zřetelně více inhibiční účinky než metanol.



Obr. 13: Procentuální inhibice fotosyntézy v různých koncentracích alkoholů, methanol -Δ-, ethanol -o-, měřená pomocí vývoje kyslíku v Clarkově elektrodě YSI/5331. Teplota 19 °C, ozáření LED 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.
Do koncentrace 1 % měl nižší inhibiční efekt ethanol, ve vyšších koncentracích

4.1.3. Chyba měření fotosyntetického vývoje kyslíku.

Mez citlivosti měření odezvy fotosyntetického organismu na přítomnost herbicidu závisí nejen na tvaru vzájemné závislosti těchto dvou veličin ale také na chybě měření, kterou je metoda zatížena. Předpokládala jsem, že chyba měření fotosyntetického vývoje kyslíku bude záviset, kromě jiných parametrů, také na koncentraci řasové suspenze.

Výsledky měření fotosyntetického vývoje kyslíku při různých koncentracích chlorofylu v suspenzi *Phaeodactylum tricornutum* jsou v Tab. 3. Vývoj kyslíku jsem měřila Clarkovou elektrodou v subsaturačním světle, při teplotě 19 °C. Průměrné hodnoty byly získány z pěti měření.

Tab. 3

Koncentrace chlorofylu, μM	0,3	1	3	10	18
Fotosyntéza, $\mu\text{M}(\text{e})/\text{mMChl.s}$	150,0	101,8	107,7	67,2	58,7
Variance	9667,7	605,6	325,2	165,8	657,8
Střední chyba průměru	44	11	8	6	11

Nejnižší chyby měření jsem dosáhla v rozmezí koncentrace chlorofylu 3 – 10 μM , v kterém probíhala všechna měření fotosyntetického vývoje kyslíku.

4.2. Teoretický popis inhibice fotosystému II herbicidem

Pro vyhodnocení závislosti fotosyntetických aktivit a růstu řas na koncentraci herbicidu je potřebné vytvořit model, který by umožnil alespoň přibližně popsat studovanou závislost matematicky.

Mějme herbicid H, který se váže vratně na reakční centrum RC za vzniku fotosynteticky neaktivního komplexu X. Předpokládejme v prvním přiblížení, že se herbicid i reakční centra chovají, jako by byly v ideálním roztoku:



Zde k_1 a k_2 jsou rychlostní konstanty přímé a zpětné reakce. Rychlost vzniku komplexu X je uměrná okamžité koncentraci nenavázaných reakčních center [RC] a herbicidu [H].

$$v_1 = k_1 * [H] * [RC] \quad (24)$$

a rychlost jeho disociace na reaktanty

$$v_2 = k_2 * [X] \quad (25)$$

Pro reakci v rovnováze platí se rychlost tvorby komplexu X i jeho disociace rovnají:

$$k_1 * [H] * [RC] = k_2 * [X] \quad (26)$$

$$\frac{[H] * [RC]}{[X]} = \frac{k_2}{k_1} = K_{dis} \quad (27)$$

kde K_{dis} je rovnovážná disociační konstanta definující rovnovážný stav.

Dále platí, že koncentrace nenavázaných reaktantů jsou dány rozdílem celkových koncentrací a koncentrace komplexu:

$$[RC] = [RC]_{tot} - [X] \quad (28)$$

$$[H] = [H]_{tot} - [X] \quad (29)$$

Odtud plyne

$$K_a = \frac{([H]_{tot} - [X]) * ([RC]_{tot} - [X])}{[X]} \quad (30)$$

Tuto rovnici lze upravit do kvadratického tvaru:

$$[X]^2 - (K_a + [RC]_{tot} + [H]_{tot}) * [X] + [RC]_{tot} * [H]_{tot} = 0 \quad (31)$$

Tato kvadratická rovnice má dvě řešení:

$$[X] = \frac{(K_{dis} + [H]_{tot} + [RC]_{tot}) \pm \sqrt{(K_{dis} + [H]_{tot} + [RC]_{tot})^2 - 4[H]_{tot} * [RC]_{tot}}}{2} \quad (32)$$

Reálný význam má jen řešení, které vede k závěru, že při nulové koncentraci herbicidu je nulová i koncentrace komplexu:

$$[X] = \frac{(K_{dis} + [H]_{tot} + [RC]_{tot}) - \sqrt{(K_{dis} + [H]_{tot} + [RC]_{tot})^2 - 4[H]_{tot} * [RC]_{tot}}}{2} \quad (33)$$

Měříme-li fotosyntetickou reakci, která lineárně závisí na koncentraci aktivních reakčních center PSII, např. světlem limitovaný fotosyntetický vývoj kyslíku nebo Hillovu reakci, bude inhibice této reakce záviset na koncentraci komplexu s herbicidem následujícím způsobem:

$$I = 100 \cdot \frac{[X]}{[RC]_{tot}} \quad (34)$$

Tedy, míra inhibice takové reakce herbicidem závisí na hodnotě disociační konstanty, koncentraci reakčních center a koncentraci herbicidu podle rovnice

$$I = 100 \cdot \frac{(K_{dis} + [H] + [RC]_{tot}) - \sqrt{(K_{dis} + [H] + [RC]_{tot})^2 - 4 \cdot [H] \cdot [RC]_{tot}}}{2 \cdot [RC]_{tot}} \quad (35)$$

Uvedený model je velmi nepřesný, neboť ani herbicid a tím méně reakční centra se nevyskytují v ideálním roztoku. Přesto takto odvozená rovnice často poměrně přesně vystihuje experimentálně naměřené křivky. Fyzikální význam disociační konstanty je však narušen a proto se konstanta K_{dis} správněji nazývá zdánlivou disociační konstantou a označuje se K_{app} .

Vzorec pro inhibici postihující 50% PSIIRC je možné získat dosazením $I=50$ do rovnice (35):

$$H_{50} = K_{app} + [RC]/2 \quad (36)$$

Tedy pro koncentraci reakčních center $[RC]$, která je podstatně menší než K_{app} , bude 50% inhibice dosaženo při koncentraci herbicidu $[H] = K_{app}$.

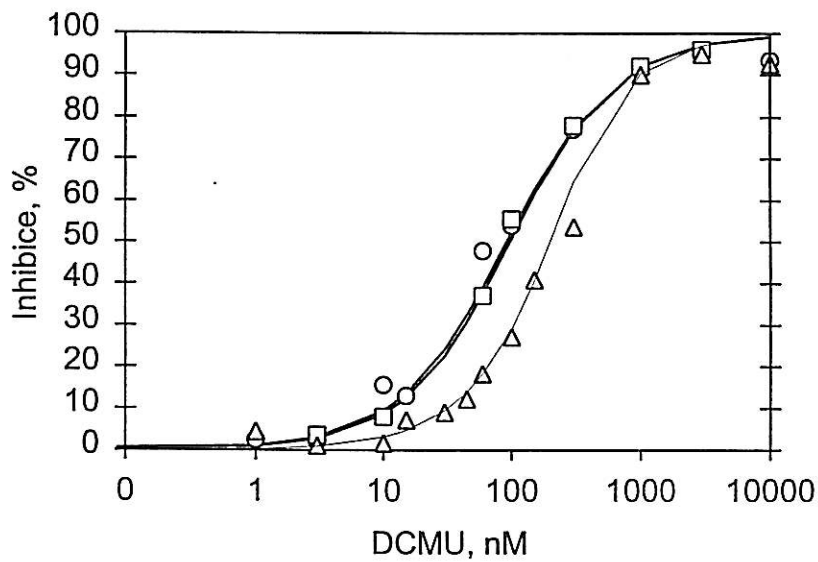
Citlivost suspenze řas k přítomnosti herbicidu bude stoupat s klesající koncentrací reakčních center a tedy i chlorofylu v suspenzi. Meze této závislosti bude dosaženo při koncentracích reakčních center $[RC] \ll K_{app}$. Nezanedbatelné také je, že při nízkých koncentracích reakčních center je vysoká chyba měření a tím se citlivost metody naopak snižuje (viz oddíl 4.1.3.).

4.3. Experimentální prověření teoretického modelu

Obr.14 ukazuje závislost rychlosti světlem limitovaného vývoje kyslíku na koncentraci DCMU. Závislost byla měřena pro tři různé koncentrace řasových suspenzí.

Nalezli jsme parametry K_{app} a $[RC]/Chl$, které poskytovaly nejlepší soulad mezi naměřenými daty a teoretickou krivkou popsanou rovnicí (35). Zdánlivá disociační konstanta K_{app} poskytující takový soulad je 80nM a poměr reakčních center k chlorofylu je 1:250.

S těmito parametry je soulad mezi teoretickými krivkami a naměřenými daty přijatelný.



Obr. 14: Procentuální inhibice fotosyntézy herbicidem DCMU měřená vývojem kyslíku Clarkovou elektrodou YSI/5331 ve třech koncentracích suspenze *Phaeodactylum tricorutum*: koncentrace chlorofylu 3,4 μM (○), 5,85 μM (□) a 56 μM(Δ). Naměřené hodnoty byly proloženy teoretickou křivkou podle vzorce (35).

5. VÝSLEDKY BIOTESTU

Záměrem následujícího experimentu bylo charakterizovat kulturu rozsivky *Phaeodactylum tricornutum*, která byla napěstována pro přípravu inokula pomocí titrace fotosyntetického vývoje kyslíku a fluorescence odrážející Q_A^- reoxidaci herbicidem (akutní testy) a výsledek srovnat s výsledkem následného biotestu (chronický test). Lze očekávat, že naměřené křivky inhibice fotosyntézy budou přibližně odpovídat teoretické křivce popsané rovnicí (35) v oddíle 4.2. pro $K_{app} \approx 80$ nM. Tento předpoklad bylo nutné prověřit, neboť parametry titrace mohou záviset na fyziologickém stavu kultury.

Výsledek biotestu, tedy závislost růstové rychlosti na koncentraci diuronu v kultuře, se může od titrace fotosyntézy odlišovat vlivem adaptace a selekce resistantních buněk.

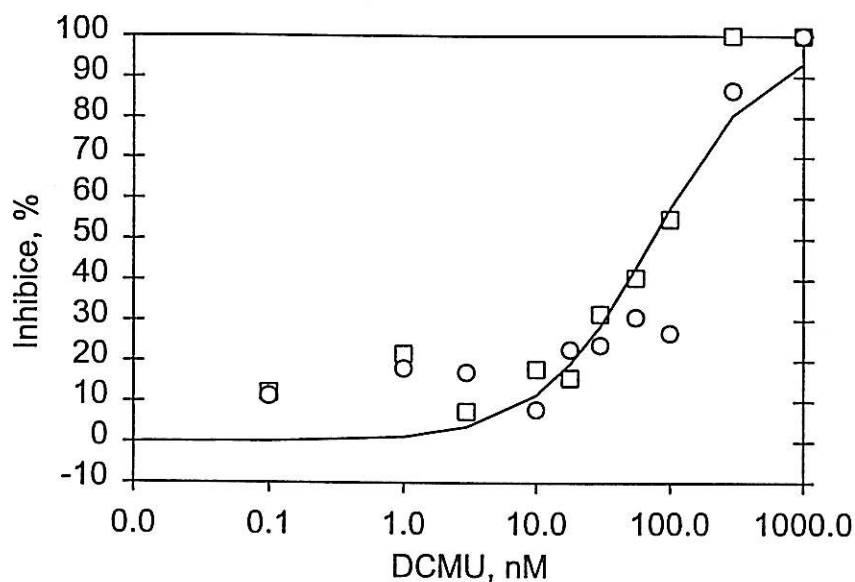
5.1. Titrace fotosyntetického vývoje kyslíku diuronem

Titrace byla provedena v subsaturující a saturující ozářenosti. Data získaná v subsaturující ozářenosti poskytují informaci o redukcí počtu aktivních reakčních center fotosystému II herbicidem. Také určují redukcí fotosyntézy, kterou je třeba očekávat alespoň v počáteční fázi biotestu než se uplatní adaptační a selekční mechanismy.

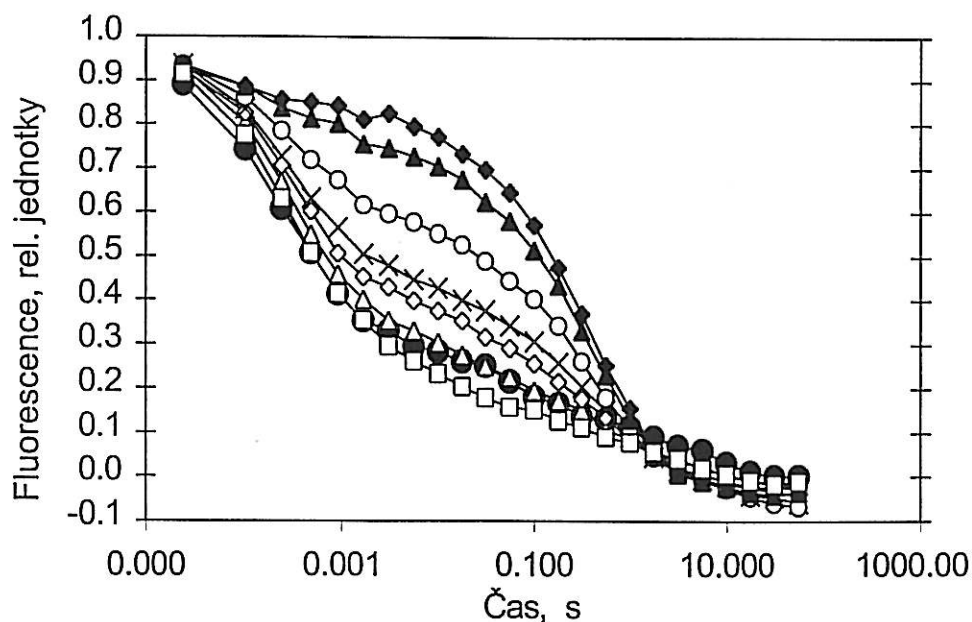
Naměřená data v subsaturující ozářenosti dobře korelují s teoretickou křivkou inhibice fotosyntézy (**Obr. 15**) popsané rovnicí (35) v oddíle 4.2. pro $K_{app} = 56$. V saturujícím světle inhibuje fotosyntézu koncentrace herbicidu od 56 nM, EC50 je 150nM DCMU.

5.2. Titrace kinetiky Q_A^- reoxidace diuronem

Fluorescenční emise provázející Q_A^- reoxidaci po sytícím jednoobrátkovém záblesku odráží ve své nejpomalejší složce přítomnost reakčních center, která nejsou schopna přenést elektron na Q_B v čase, který by umožňoval normální fyziologickou funkci fotosystému. Taková centra vznikají vazbou herbicidu v Q_B kapse. Měřením Q_A^- reoxidace lze stanovit míru inhibice fotosyntézy a procento blokováných RC.



Obr. 15: Procentuální inhibice fotosyntézy různými koncentracemi DCMU měřena vývojem kyslíku Clarkovou elektrodou YSI/5331 v subsaturujícím ($303 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (□) a saturujícím světle ($1016 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (○). Teplota 19°C . Data jsou proložena teoretickou křivkou inhibice fotosyntézy pro $K_{\text{app}} = 56$ a $[\text{RC}]/\text{Chl} = 4$. V tomto experimentu byly simulovány podmínky, v kterých se nacházely rozsivky na začátku biotestu. Na měření byla použita koncentrace chlorofylu $3,2 \mu\text{M}$.

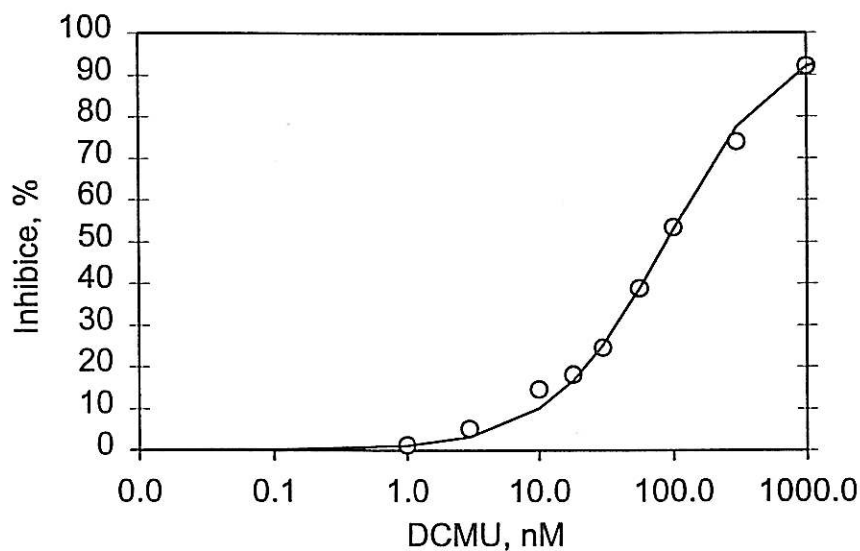


Obr. 16: Pokles variabilní fluorescence populace *Phaeodactylum tricoratum* o koncentraci chlorofylu $3,2 \mu\text{M}$ měřená v dvoumodulačním fluorimetru FL-100 po jednoobrátkovém sytícím záblesku ($25 \mu\text{s}$) v nulté hodině biotestu. Mírou inhibice fotosyntézy je a_3 . Toto měření simulovalo podmínky řas na začátku biotestu.

Koncentrace DCMU ve vzorcích: ●- 0 nM, □- 3 nM, △- 10 nM, ◇- 30 nM, ×- 56 nM, ○- 100 nM, - - 300 nM, ◆- 1000 nM.

V závislosti na zvyšující se koncentraci DCMU se mění rychlost a amplituda zhášení (Obr. 16), od koncentrací nad 10 nM DCMU je redukce fotosyntézy zřetelná.

Křivka teoretické dobře prokládala naměřené hodnoty (Obr. 17).



Obr. 17: Procentuální inhibice fotosyntézy v nulté hodině biotestu měřená pomocí kinetiky Q_A^- reoxidace v dvoumodulačním fluorimetru FL-100 u kultury rozsivky *Phaeodactylum tricornerutum* po krátkém saturačním jednoobrátkovém záblesku (25 μ s) v různých koncentracích herbicidu DCMU. Koncentrace chlorofylu suspenze byla 3,2 μ M. Průměrné hodnoty inhibice fotosyntézy DCMU (O) jsou proloženy teoretickou křivkou inhibice (-).

Od koncentrace 10 nM DCMU je inhibice fotosyntézy dobře detekovatelná, nad 10 % 50 % inhibice (EC50) způsobuje koncentrace 90 nM.

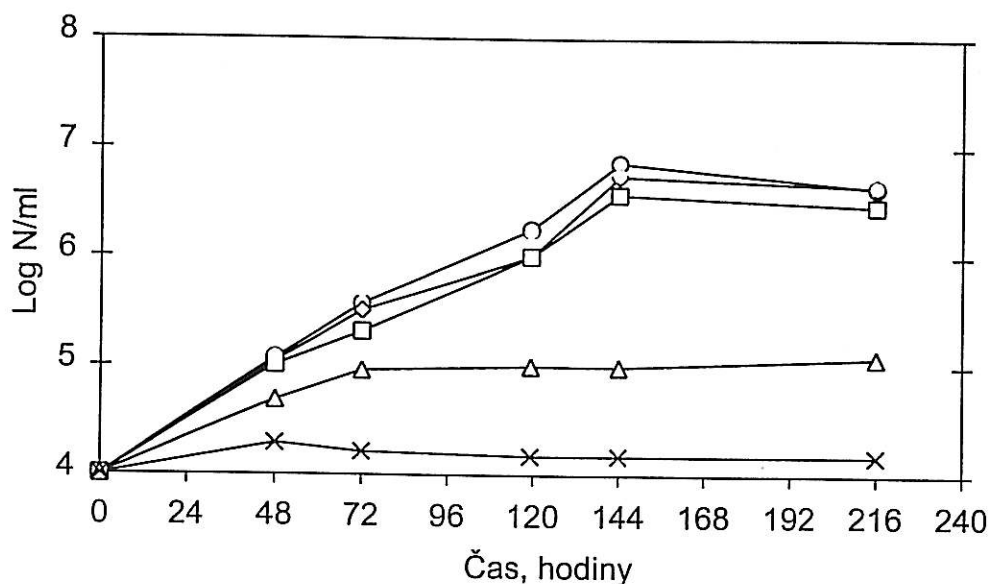
5.3. Biotest

Z kultury vyšetřené v oddílech 5.1. a 5.2. jsme odebrali inokulum pro biotest podle ISO 10253 standardu. Růst kultur s příměsí různých koncentrací diuronu byl sledován pomocí hustoty buněk, optické hustoty při 750 nm (OD750). Na konci jsem stanovovala koncentraci chlorofylu. Biotest probíhal celkem 480 hodin při teplotě 20 ± 1 °C a ozáření bílým zářivkovým světlem $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

5.3.1 Vyhodnocení biotestu na základě hustoty buněk

Hustota buněk byla poprvé měřena ve 48 hodinách kultivace. Důvodem byla nepřesnost měření v nízkých hustotách buněk.

Lag fáze trvala zhruba dva dny, exponenciální a lineární fáze růstu byly ukončeny v šestém dnu inkubace. Od šestého dne se kultury nacházely ve stacionární fázi růstu (Obr. 18).



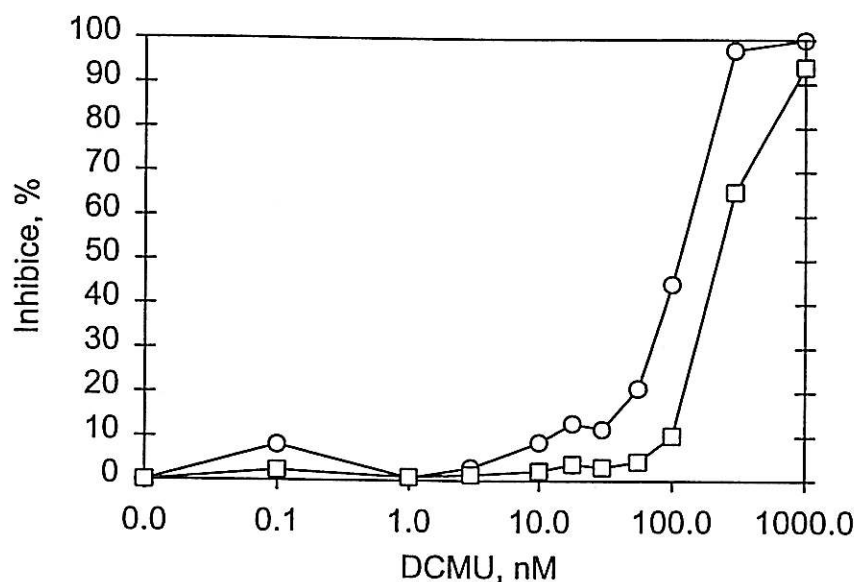
Obr. 18: Růst rozsivky *Phaeodactylum tricorutum* v médiích s různými koncentracemi DCMU, 0 až 30 nM -O-, 56 nM -◊-, 100 nM -□-, 300 nM -Δ-, 1000 nM -×-, v průběhu trvání biotestu podle ISO 10253.

Kultivační podmínky: teplota 20 ± 1 °C, ozáření bílým světlem $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Přírůstek biomasy byl stanovován jako počty buněk na mililitr (hustota buněk), jednotlivé body jsou průměrem ze dvou měření, hodnoty byly zlogaritmovány.

Kultury s koncentracemi do 56 nM DCMU měly shodnou růstovou rychlost i výtěžek biomasy na konci pokusu. Růst byl inhibován v průběhu celého růstu v suspenzi rozsivek se 100 nM koncentrací DCMU. Počty buněk byly v porovnání s kontrolou ve stacionární fázi růstu o více než třetinu nižší.

Inhibici růstu kultur *Phaeodactylum tricorutum* v závislosti na různých koncentracích DCMU jsem vyhodnocovala podle integrálu biomasy (I_A , viz vzorce 14, 15 v části 3.3.5) a růstové rychlosti (I_μ , vzorce 16, 17 v téže části).

Podle integrálu biomasy (I_A) se inhibice růstu zvyšuje na 20 % v koncentraci 56 nM (Obr. 19). Jak 300 nM, tak 1000 nM DCMU inhibuje růst zcela. EC_{50} podle integrálu biomasy je 100 nM a podle růstové rychlosti 250 nM.



Obr. 19: Procentuální inhibice růstu rozsivky *Phaeodactylum tricorneratum* herbicidem DCMU v průběhu biotestu stanovovaná jako redukce integrálu biomasy, I_A -O- a růstové rychlosti, I_μ -□-. Jednotlivé body jsou průměrem ze dvou měření. Kulturační podmínky biotestu: teplota 20 ± 1 °C, ozáření $100 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ bílým světlem.

5.3.2 Vyhodnocení biotestu na základě optické hustoty při 750 nm

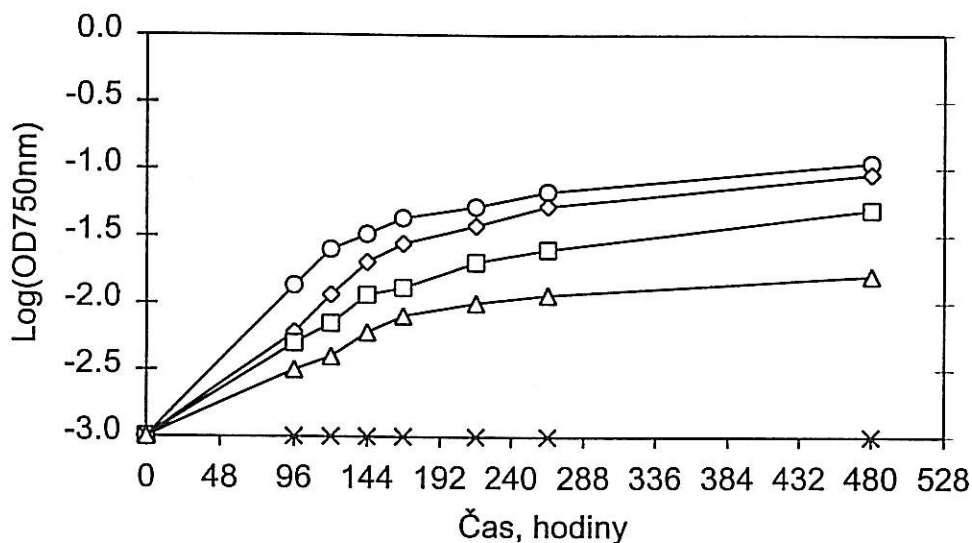
Poprvé byla optická hustota měřena až v 96. hodině inkubace, ze stejného důvodu, jako měření hustoty buněk. V nízkých hustotách buněk v lag fázi růstové křivky, dochází při měření k velké chybě.

Suspenze rozsivek s koncentracemi do 30ti nM DCMU se rychlostí růstu ani hodnotami OD 750 nm nelišily od kontroly (Obr. 20). Inhibice růstu se od začátku biotestu projevovala v koncentracích 56 – 300 nM. V koncentraci 1000 nM DCMU tato metoda nezaznamenala žádný růst.

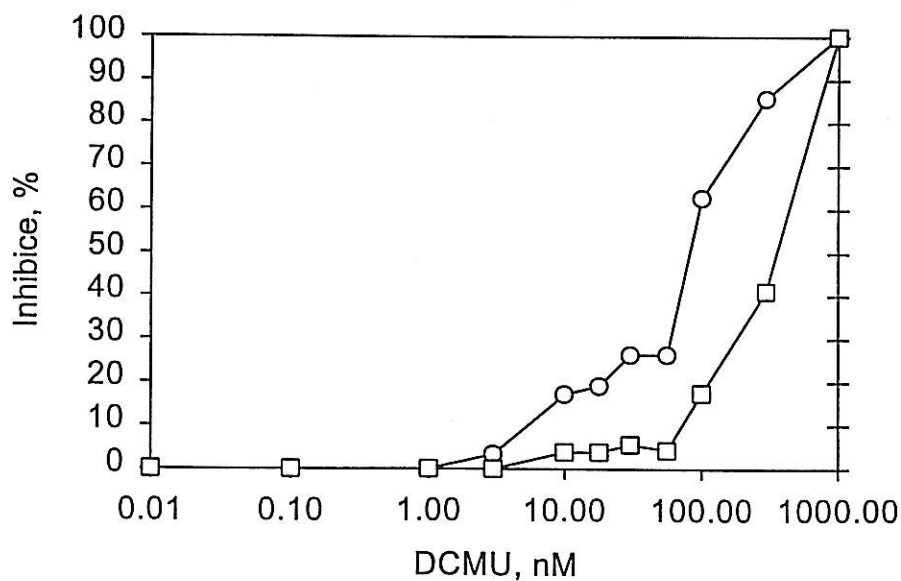
V čase, kdy růst rozsivek byl ve všech testovaných koncentracích ve stacionární fázi růstu, se hodnoty OD 750 nm se neustále mírně zvyšovaly. Tento neustálý nárůst může být způsoben rozdílným rozptylem světla na prázdných schránkách, které se ve starých kulturách hromadí.

Inhibici růstu jsem počítala také z integrálu biomasy (I_A , viz vzorce 14, 15 v části 3.3.5) a z růstové rychlosti (I_μ , vzorce 16, 17 v téže části). Zvýšená inhibice růstu podle integrálu biomasy (I_A) je patrná v koncentraci 10 nM DCMU (Obr. 21). Inhibice 50 %

(EC50) je v koncentraci 90 nM DCMU. Hodnocení pomocí růstové rychlosti (I_{μ}) vykazuje téměř 20ti % inhibici růstu ve 100 nM herbicidu, EC50 pro rychlost růstu je 400nM.



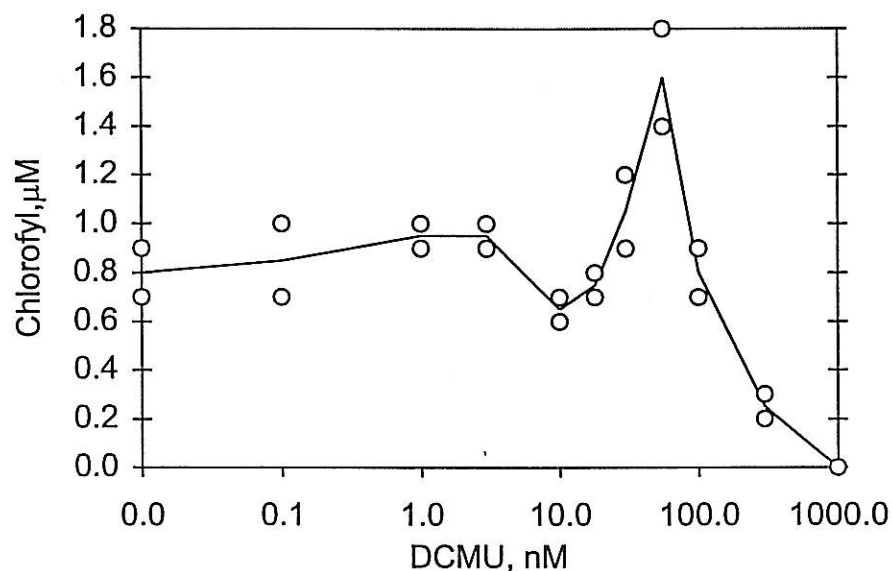
Obr. 20: Růst rozsivky *Phaeodactylum tricorutum* v médiích s různými koncentracemi DCMU, -○- 0 až 30 nM, -◊- 56 nM, -□- 100 nM, -△- 300 nM, -×- 1000 nM, v průběhu trvání biotestu ISO 10253. Podmínky kultivace: teplota 20 ± 1 °C, ozáření bílým světlem $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Přírůstek biomasy byl stanovován měřením optické hustoty při 750 nm. Vynesené hodnoty OD 750 nm jsou průměry ze dvou opakování, které byly zlogaritmovány.



Obr. 21: Procentuální inhibice fotosyntézy rozsivky *Phaeodactylum tricorutum* herbicidem DCMU v průběhu biotestu ISO 10253 stanovovaná jako redukce integrálu biomasy, I_A -○- a růstové rychlosti, I_{μ} -□-. Vynesené hodnoty jsou průměrem ze dvou opakování. Kultivační podmínky biotestu: teplota 20 ± 1 °C, ozáření bílým světlem $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

5.3.3. Koncentrace chlorofylu

Koncentraci chlorofylu jsem měřila ve stacionární fázi růstu kultur, v 256. hodině inkubace. Do koncentrace 30 nM DCMU se suspenze rozsivek v koncentraci chlorofylu nelišily (Obr. 22). Maximum chlorofylu obsahovaly kultury v 56ti nM DCMU, kde se nejvíce projevila adaptace k přítomnosti herbicidu. Ve vyšších koncentracích se jeho obsah snižoval v důsledku zablokování velkého procenta Q_B kapsy herbicidem.



Obr. 22: Koncentrace chlorofylu [μM] v různých koncentracích herbicidu DCMU [nM] v 256té hodině biotestu. Kulturační podmínky biotestu: teplota $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, ozáření bílým světlem $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Kultury měly dvě opakování, z koncentrace chlorofylu (-O-) byl vypočítán aritmetický průměr (-).

5.3.4. Srovnání hodnot EC_{50} zjištěných různými metodami

Tab. 4 Akutní testy

Fotosyntetický vývoj kyslíku EC_{50} , nM	56
Fluorescence EC_{50} , nM	90

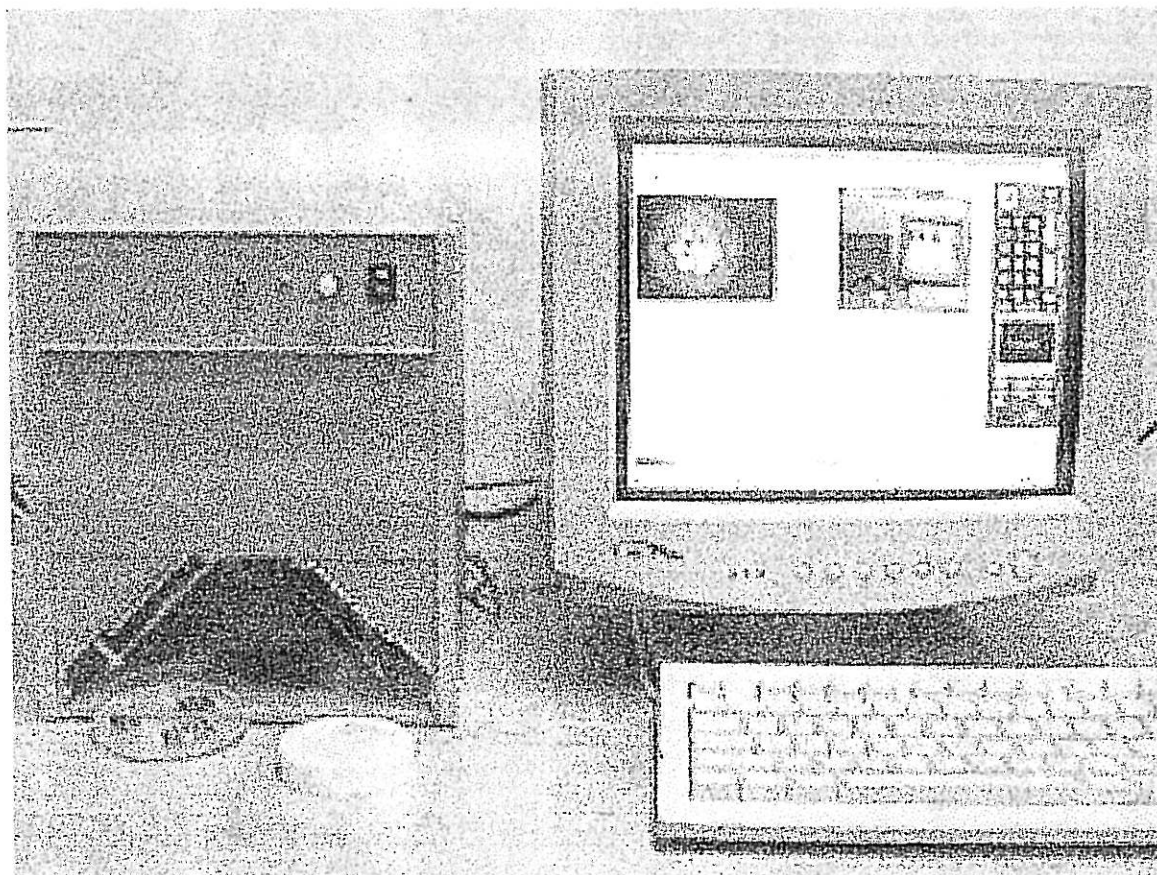
Tab. 5 Biotest

	Integrál biomasy, I_A	Růstová rychlost, I_μ
Hustota buněk EC_{50} , nM	100	250
OD 750 nm EC_{50} , nM	90	400

6. NÁVRH VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ CCD KAMERY

V průběhu experimentů biotestu byla v naší laboratoři zkoušena nová fluorescenční CCD kamera, která byla navržena pro screening mutantů sinic vyrostlých v Petriho misce na agaru. Tato kamera vznikla v součinnosti s M.Trilkem z firmy P.S. Instruments, Brno, L.Nedbala z Mikrobiologického ústavu v Třeboni a H.Pakrasiho z Washington University v St.Louis. Výsledky uvedené zde v oddíle 5.2. mě dovedly k záměru pokusit se tohoto přístroje využít k sledování průběhu biotestu.

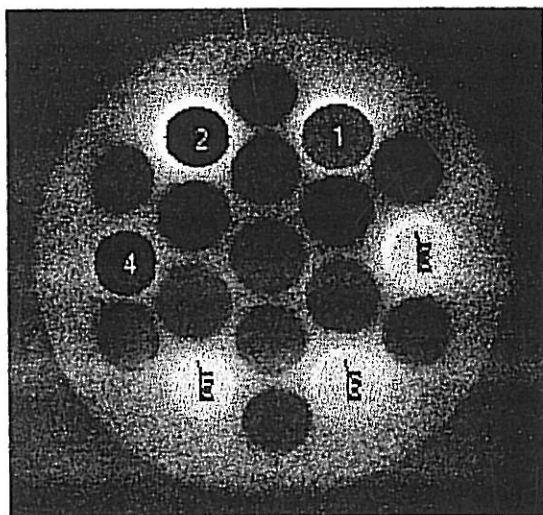
Na **Obr. 23** je snímek celého zařízení. Sestává se z prostoru pro vzorek, který je osvětlován 500 svítivými diodami. Ozáření i spouštění a vypínání světla je řízeno počítačem. Fluorescence vyzařovaná vzorkem je snímána CCD kamerou, která byla opatřena širokopásovým filtrem S-25-700-F (Corion, Holliston, MA, USA) s frekvencí snímkování 25 Hz. Toto časové rozlišení umožní zachytit pomalou fázi fluorescenční indukce (oddíl 1.3.1).



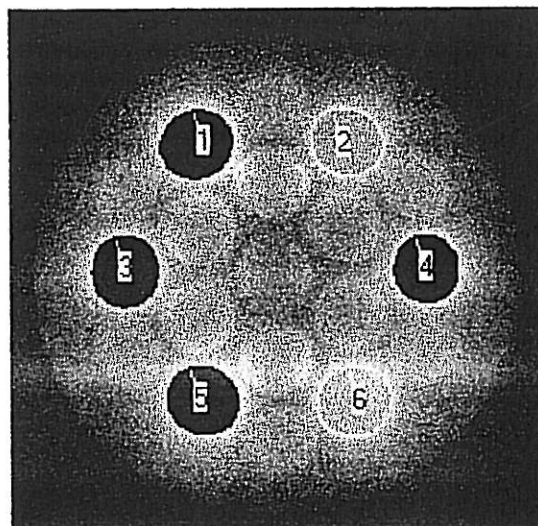
Obr. 23: Snímek celkového zařízení pro CCD kameru.

Na Obr. 24 je záběr rozložení minimální fluorescence (F_0) na teflonové titrační destičce, kterou jsme pro tento účel speciálně zhotovili. Jednotlivé vzorky se od sebe liší koncentrací suspenze roztivky *Phaeodactylum tricorutum*.

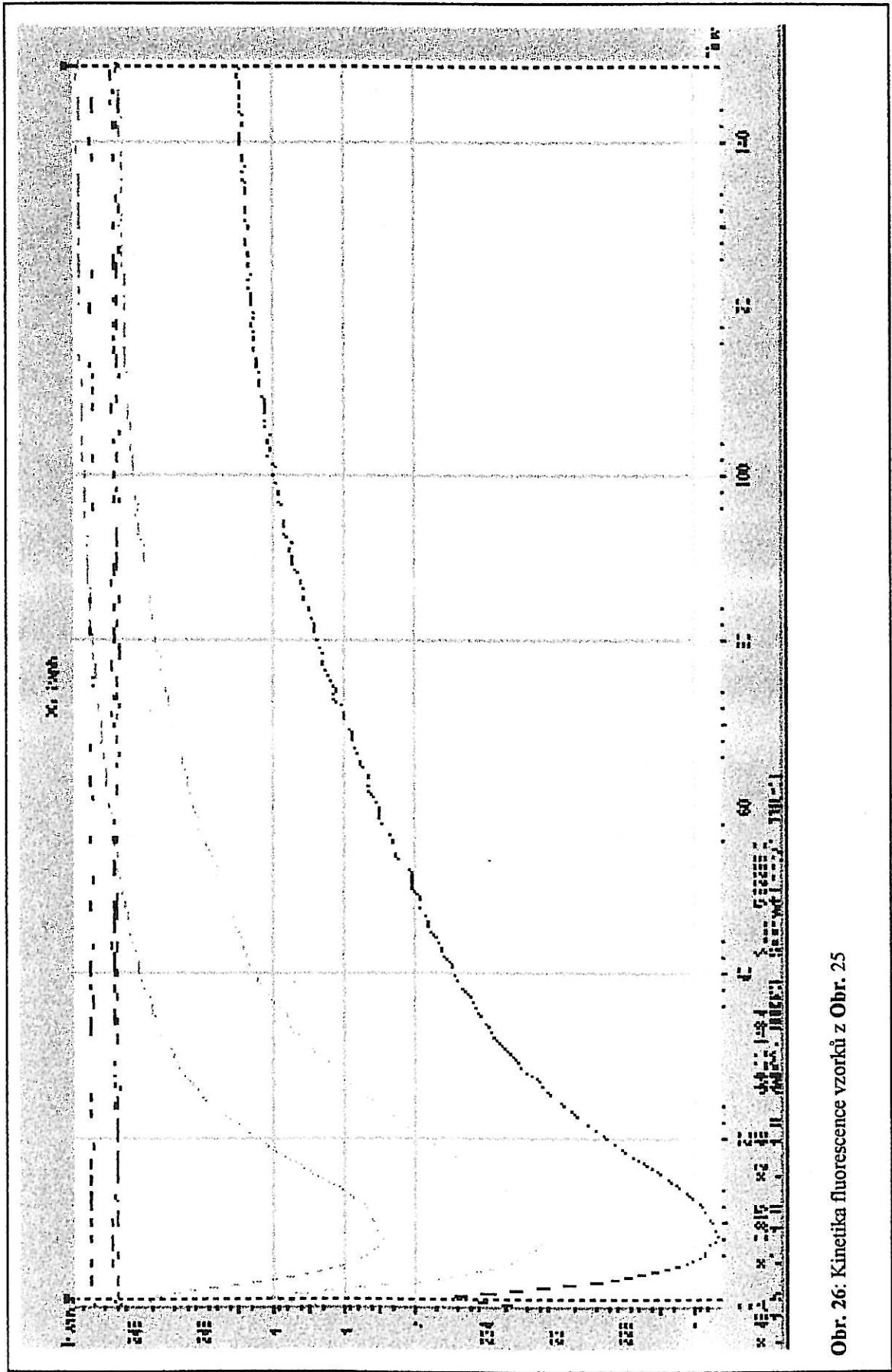
Obr. 25 ukazuje rozložení maximální fluorescence (F_p) ve třech vzorcích s přidaným diuronem a ve třech vzorcích bez herbicidu. Obr. 26 ukazuje kinetiku fluorescenční indukce jednotlivých vzorků. Barevná škála představuje zvyšující se fluorescenci od tmavě modré přes zelenou, žlutou, oranžovou po červenou.



Obr 24: Minimální fluoresce (F_0). vzorků *Phaeodactylum tricorutum* se stoupající koncentrací chlorofylu:(tmavě modrá) až(červená).



Obr. 25: Rozdíl maximální fluoresce (F_p) mezi vzorky s DCMU (červené) a bez DCMU (modré a zelené). Variabilita fluoresce ve vzorcích bez DCMU je způsobena různou koncentrací chlorofylu ve vzorcích.



Obr. 26: Kinetika fluorescence vzorků z Obr. 25

7. DISKUSE

Vzhledem ke skutečnosti, že populace rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* roste v průběhu biotestu ve stresových podmínkách po několik generací, předpokládala jsem, že v průběhu růstu dochází ke změnám ve fyziologii (poměry množství zásobních látek, lipidových membrán, chlorofylu...atd.) a tím i k adaptaci a selekci resistantních buněk.

Prudké zvýšení koncentrace chlorofylu v kultuře s 56 nM DCMU přisuzuji právě adaptačním mechanismům řas. Se zvyšující se koncentrací herbicidu v médiu je stále větší množství PSIIRC blokováno vazbou DCMU na Q_B kapsu. Deficit funkčních PSIIRC řasy kompenzovaly zvětšováním chlorofylových antén. Tyto zvětšené antény pohltily dostatečný počet fotonů, funkční RC stačily zásobovat elektrony další komponenty řetězce, takže celkový růst nebyl inhibován. V koncentracích herbicidu nad 56 nM je příliš velké procento PSIIRC blokováno, tento mechanismus již nebyl dostačující a růst v kulturách byl redukován.

Dalším důkazem probíhajících mechanismů adaptace a selekce je výsledek dlouhodobé kultivace kultur rozsivek v koncentracích DCMU 300 a 1000 nM. Tyto kultury jsem ~~jsem~~ nechala po ukončení biotestu dále růst ve shodných kultivačních podmínkách. Ačkoliv ve 480ti hodinách, tedy na konci trvání biotestu, byly populace rozsivek ve stacionární fázi růstu růstové křivky (měřeno hustotou buněk), po celkové době inkubace (zahnující i dobu trvání biotestu) asi 1000 hodin, se v těchto médiích vytvořila biomasa buněk s koncentrací chlorofylu kolem 2 μM .

Citlivost biotestu k různým koncentracím DCMU je probíhající adaptací a selekcí snížena. Proto by se měly výsledky chronického testu lišit od výsledků testů akutních. V případě vyhodnocení biotestu na základě růstové rychlosti (I_μ) se tato teorie potvrzuje. Vyhodnocení podle integrálu biomasy (I_A) je srovnatelné s výsledky měření Q_A^- reoxidace.

Ovšem význam integrálu biomasy ve vztahu k růstu není úplně jasný. Mohl by vyjadřovat množství buněk v průběhu celého růstu, popř. jednalo-li by se o nějaké metabolity produkované řasami, vyjadřoval by celkové množství vytvořených látek v průběhu růstu (Simmer, osobní sdělení). Míra inhibice vyjadřovaná tímto způsobem závisí na čase, který experimentátor určí za konec exponenciální fáze růstu. Vnáší tak do vyhodnocení subjektivní chybu.

Po úpravě vzorců 14, 15 z kapitoly 3.3.5:

$$I_{Ai} = 1 - \frac{N_i * \mu_c * (\exp(\mu_i * t) - 1)}{N_c * \mu_i * (\exp(\mu_c * t) - 1)} \quad (37)$$

kde:

I_{Ai} - inhibice v i - tém vzorku

N_i - koncentrace buněk ve testované koncentraci DCMU v nulté hodině biotestu

N_c - koncentrace buněk v kontrole v nulté hodině biotestu

μ_i - růstová rychlost řas v ve testované koncentraci DCMU

μ_c - růstová rychlost řas v kontrole

t - čas

Z uvedeného vzorce je zřejmé, že $t \rightarrow 0$, je míra inhibice rovna $1 - N_i/N_c$ a pro $t \rightarrow \infty$ je rovna jedné pro jakékoliv hodnoty μ ($\mu_i < \mu_c$) (Simmer, osobní sdělení). Subjektivní určení konce exponenciální fáze růstové křivky tedy ovlivňuje hodnotu inhibice růstu.

Proto se domnívám, že pro určování inhibice růstu v biotestu je směřodratnější vyhodnocování podle růstové rychlosti.

V této práci jsem stanovovala pouze hodnotu EC50. Hodnota EC10 byla ovlivněna mechanismem adaptace, pro statistické určení NOEC jsem neměla dostatek opakování, proto jsem těmito charakteristikami nepracovala.

Jak testy akutní, tak chronické mají své klady a zápory. Akutní testy jsou citlivější k přítomnosti DCMU, je zde dobře vidět variabilita kultur v hodnotách K_{app} v několika měřeních. Nejsou ovlivňovány složením médií, nezahrnují však kritický moment životního cyklu, rozmnožování (Maršálek, 1993). Chronické testy jsou ovlivněny procesem adaptace a selekce buněk, stanovování růstu měřením hustoty buněk je pracné a zdoluhavé. Jistým vylepšením z tohoto hlediska je stanovování růstu pomocí optické hustoty při 750 nm. Tato metoda je nedestruktivní, ale v případě rozsivek narážíme na některé problémy. Buňky mají křemičité schránky, které se po odumření buněk hromadí v suspenzi a zvyšují tak rozptyl světla.

Z výše uvedených důvodů si myslím, že pro vyhodnocování inhibice růstu herbicidem je možné využít kladů akutních i chronických testů. Fluorescence je nedestruktivní rychlá metoda, jejíž pomocí hodnotíme pouze přímou inhibici PSIIRC herbicidem, není ovlivněna množstvím lipidových membrán a zásobních látek. Je, podle mého názoru, dobrou metodou vyhodnocování inhibice růstu v biotestu. V teflonové destičce lze CCD kamerou zjišťovat

fluorescenci až 19ti vzorků najednou. Používáním této kamery by se velice urychlilo vyhodnocování růstových inhibičních testů.

8. ZÁVĚR

Padesátiprocentní inhibice růstu (EC50) testované rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* v biotestu podle ISO 10253 byla dosažena v koncentraci DCMU 250 nM. Tato hodnota byla zjištěna měřením hustoty buněk jako parametru růstu. Stanovování růstu podle optické hustoty při 750 nm je v případě rozsivek nevhodné. Titrací fotosyntetického vývoje kyslíku a fluorescenční emisí herbicidem jsem určila hodnotu zdánlivé disociační konstanty: $K_{app} \approx 80$ nM a průměrný počet molekul chlorofylu na reakční centrum fotosystému II: Chl/PSIIRC = 250. Rozdíl mezi okamžitou reakcí fotosyntézy na herbicid (K_{app}) a reakcí řas v biotestu (EC50) může být vysvětlen adaptací na subletální koncentrace DCMU a selekcí resistantních buněk v průběhu biotestu. Toto vysvětlení podporuje i nárůst biomasy rozsivky *Phaeodactylum tricornutum* v koncentracích 300 a 1000 nM DCMU po dlouhodobé inkubaci.

Pro urychlení hodnocení růstu v biotestu je možné využít CCD kamery, která měří fluorescenční emisí v několika vzorcích najednou. Spojením výhod akutních testů toxicity, v tomto případě měření fluorescenční emise, s růstovým inhibičním testem je možné dosáhnout vyšší citlivosti biotestu, kratší doby kultivace i snížení pracnosti vyhodnocování změn růstu.

9. SEZNAM LITERATURY

- BRINGMANN, G. et KÜHN, R. (1978): Grenzwerte der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen Blaualgen (*Microcystis aeruginosa*) und Grünalgen (*Scenedesmus quadricauda*) im Zellvermehrungshemmtest. - Wasser 50: 45 - 60
- BUSER, H. R. (1990): Atrazine and other s-triazine herbicides in lakes and in rainfall in Switzerland. Envir. Sci. Technol. 26: 14 - 21
- DOUCHA, J. et KUBÍN, Š. (1975): Die Synthese der Chlorophylle und die Veränderung ihrer Spezifischen in Vivo – Absorption im Laufe des Zellzyklus von *Scenedesmus quadricauda*. - In: Izučenie intenzivnoj kultury vodoroslej II. Třeboň, p. 59 – 72
- DRABER, W., TIETJEN, K., KLUTH, J. F. et TREBST, A. (1991): Herbicides in photosynthesis research. - Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 30: 1621 – 1633
- DUYSENS, L. N. M. et SWEERS, H. E. (1963): Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence - In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria. - Jpn. Soc. Plant Physiol. Univ. of Tokyo Press, Tokyo, p. 353 – 373
- FORSBERG, C. et FORSBERG, A. (1972): Algal growth potential test. - Ambio 1: 26 – 29 (non vidi)
- FRANCOIS, D.L. et ROBINSON, G. G. C. (1990): Indices of atrazine toxicity in *Chlamydomonas geitleri* Ettl. – Aquatic toxicol. 16: 205 - 228.
- GOLDSBOROUGH, L. G. et ROBINSON, G. G. C. (1984): A simple bioassay for photosystem-II inhibitors in water using *in vivo* chlorophyll fluorescence. - Weed Res. 24: 351-358
- GOOD, N. E. (1961): Inhibitors of the Hill reaction. - Plant. Physiol. 36: 788 - 803
- HAGLUND, K. (1997): The use of algae in aquatic toxicity assessment. – Progress in Phycological Res. 12: 181-212
- HUMPREY, G. F. (1979): Photosynthetic characteristics of algae grown under constant illumination and light – dark regime. – Exp. Mar. Biol. Ecol. 40: 63-70 (non vidi)
- ISO 10253 (1995): Water quality – marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornerutum*. – ISO 10253, 8 pp.
- ISO 14442 (1998): Water quality – guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water. – ISO 14442, 12 pp.

- ISO 8692 (1997): Water quality – fresh water algal growth inhibition text with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. – ISO 8692, 11 pp.
- IZAWA, S. (1977): Inhibitors of electron transport. - In: Encyclopedia of Plant Physiology. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation. New Series. Vol. 5, p. 266 - 283
- JAY, E. A. (1996): Effect of organic solvents and solvent – atrazine interaction on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. – Arch. Environ. Toxicol. 31: 84 - 90
- JAY, E. A., DUCRUET, J. M., DUVAL, J. C. et PELLETIER, J. P. (1997): A high – sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: comparison with effect on cell growth. - Arch. Hydrobiol. 140: 273 – 286
- JEFFREY, S. W. et HUMPREY, G. F. (1975): New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. – Biochem. Physiol. Pflanzen 167: 191-194
- KASAI, F., TAKAMURA, N. et HATAKEYAMA, S. (1993): Effect of simetryone on growth of various freshwater alga taxa. - Environ. Pollut. 79: 77-83.
- KRAUSE, G. H. et WEIS, E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. - Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 313 – 349
- KRAVČUK, O. et PUNKO, V. (1996): Methods of geotoxicological investigations. Recreation resources of Ukraine, Odessa: MRB (non vidi)
- KUBÍN, Š. (1994): Test toxicity založený na inhibici růstu řasových populací. - Závěrečná zpráva AV ČR – Mikrobiologický ústav Třeboň a Státní fond životního prostředí, Praha: 187 pp.
- KUTHAN, A. (1985): In: Vodní hospodářství B 35(7): 187 – 190 (non vidi)
- LEWIN, J. C. (1958): The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. – J. gen. Microbiol. 18: 427 – 432
- LHOTSKÝ, O. (1979): Selected bibliography on the methodology of algal assay. – In: Algal Assays, p: 239 – 253
- LUKAVSKÝ, J. (1983): The evaluation of algal growth potential by cultivation on solid media. - Wat. Res. 17: 549 – 558
- LUKAVSKÝ, J. (1992): The evaluation of algal growth potential and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. – Wat. Res. 26: 1409 – 1413

- ISO 8692 (1997): Water quality – fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. – ISO 8692, 11 pp.
- IZAWA, S. (1977): Inhibitors of electron transport. - In: Encyclopedia of Plant Physiology. Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation. New Series. Vol. 5, p. 266 - 283
- JAY, E. A. (1996): Effect of organic solvents and solvent – atrazine interaction on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*. – Arch. Environ. Toxicol. **31**: 84 - 90
- JAY, E. A., DUCRUET, J. M., DUVAL, J. C. et PELLETIER, J. P. (1997): A high – sensitivity chlorophyll fluorescence assay for monitoring herbicide inhibition of photosystem II in the chlorophyte *Selenastrum capricornutum*: comparison with effect on cell growth. - Arch. Hydrobiol. **140**: 273 – 286
- JEFFREY, S. W. et HUMPREY, G. F. (1975): New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. – Biochem. Physiol. Pflanzen **167**: 191-194
- KASAI, F., TAKAMURA, N. et HATAKEYAMA, S. (1993): Effect of simetryone on growth of various freshwater alga taxa. - Environ. Pollut. **79**: 77-83.
- KRAUSE, G. H. et WEIS, E. (1991): Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. - Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **42**: 313 – 349
- KRAVČUK, O. et PUNKO, V. (1996): Methods of geotoxicological investigations. Recreation resources of Ukraine, Odessa: MRB (non vidi)
- KUBÍN, Š. (1994): Test toxicity založený na inhibici růstu řasových populací. - Závěrečná zpráva AV ČR – Mikrobiologický ústav Třeboň a Státní fond životního prostředí, Praha: 187 pp.
- KUTHAN, A. (1985): In: Vodní hospodářství B **35**(7): 187 – 190 (non vidi)
- LEWIN, J. C. (1958): The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornutum*. – J. gen. Microbiol. **18**: 427 – 432
- LHOTSKÝ, O. (1979): Selected bibliography on the methodology of algal assay. – In: Algal Assays, p: 239 – 253
- LUKAVSKÝ, J. (1983): The evaluation of algal growth potential by cultivation on solid media. - Wat. Res. **17**: 549 – 558
- LUKAVSKÝ, J. (1992): The evaluation of algal growth potential and toxicity of water by miniaturized growth bioassay. – Wat. Res. **26**: 1409 – 1413

- LUKAVSKÝ, J., MARŠÁLEK, B. et FREMROVÁ, L. (1995): Mikrometoda stanovení toxicity a trofického potenciálu řasovým testem (TNV 75 7741, oborová norma MIn. zemědělství ČR). – Hydroprojekt a. s., Praha, 15 pp.
- MARŠÁLEK, B. (1993): The comparison of microplate, bottle and fluorescence algal assay procedures. – Přednáška pro : Toxicity testing and on line monitoring. Berlin, 12 pp.
- MARŠÁLEK, B. et ROJÍČKOVÁ, R. (1995): Využití alternativních biotestů pro ekotoxikologický monitoring I. - In: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. - Aquachemie. Ostrava, p. 42 – 46
- MARVAN, P. (1976): Řasové testy – Úvod do problematiky. - In: Kolokvium o řasových testech. - Dům techniky, České Budějovice, p. 33 - 41
- MARVAN, P. et PŘIBIL, S. (1976): Faktory limitující růst řasových kultur. - In: Kolokvium o řasových testech. - Dům techniky, České Budějovice, p. 73 - 84
- MARVAN, P. et SLÁDEČKOVÁ, A. (1978): Řasy při hodnocení akosti vody. - In: Sladkovodné riasy. – SNP, Bratislava, p. 105-158
- MILLER, W. E., GREENE, J. C. et SHIROYAMA, T. (1978): The *Selenastrum capricornutum* PRINTZ algae assay bottle test. EPA-600/9-78-018. U. S. - Environment Protection Agency, Oregon, 126 pp.
- PORCELLA, D. B., GRAU, P., HUANG, C. H., RADIMSKY, J., TOERRIEN, D. F. et PEARSON, F. A. (1970): Provisional algal assay procedures. - First annual report of the Sanit. Eng. Res. Lab., Berkley, 180 pp.
- PRÁT, S. et POSPÍŠIL, F. (1951): Oscillatoria v biologických zkouškách vody. - Rozpravy II. třídy České akademie 61(22):
- RAUSCHEROVÁ, L. (1995): Alternativní biotesty pro zjišťování zbytkových účinků herbicidů. - In: Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí. – Aquachemie, Ostrava, p. 15 - 18 33 - 33
- REYNOLDS, C. F. (1984): The ecology of freshwater phytoplankton. – Cambridge University Press, Cambridge, MA, USA (non vidi)
- ROJÍČKOVÁ-PADRTOVÁ, R. (1998): Algal toxicity tests - Thesis. – Dep. Environ. Chem. Ecotoxicol, Fac. Sc., Masaryk Univ., Brno: 163 pp.
- ROUND, F. E., CRAWFORD, R. M. et MANN, D. G. (1990): The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera. – Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 560 – 564
- SHEHATA, S. A., EL-DIB, M. A. et ABOU WALY, H. F. (1995): Effect of certain herbicides on the growth of freshwater algae. - Water, Air, and Soil Polut. 100: 1-12

- SNEGAROFF, J. (1976): La pollution des eaux par les triazines herbicides dans le secteur du marais chatertains. - INRA, Phytatrie Phytopharm. **28**: 249-261.
- ŠETLÍK, I. (1997): Studijní text ke kurzu rostlinné fyziologie. - BF JU, České Budějovice $\frac{1}{4}$
- TRTÍLEK, M., KRAMER, D. M., KOBLÍŽEK, M. et NEDBAL, L. (1997): Dual-modulation LED kinetic fluorometer. - Journal of Luminiscence **72-74**: 597 - 599
- VERMAAS, W. F. J. (1984): The interaction of quinones, herbicides and bicarbonate with their binding environment at the acceptor side of photosystem II in photosynthesis - Thesis. - Landbouwhogeschool te Wageningen, 120 pp.
- WALKER, D. (1987): The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. - Research Institute for Photosynthesis, University of Sheffield. UK, 263 pp.

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
10253

First edition
1995-10-01

**Water quality — Marine algal growth
inhibition test with *Skeletonema costatum*
and *Phaeodactylum tricornutum***

*Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues marines
avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricornutum**



Reference number
ISO 10253:1995(E)

Foreword

ISO (the International Organization for Standardization) is a worldwide federation of national standards bodies (ISO member bodies). The work of preparing International Standards is normally carried out through ISO technical committees. Each member body interested in a subject for which a technical committee has been established has the right to be represented on that committee. International organizations, governmental and non-governmental, in liaison with ISO, also take part in the work. ISO collaborates closely with the International Electrotechnical Commission (IEC) on all matters of electrotechnical standardization.

Draft International Standards adopted by the technical committees are circulated to the member bodies for voting. Publication as an International Standard requires approval by at least 75 % of the member bodies casting a vote.

International Standard ISO 10253 was prepared by Technical Committee ISO/TC 147, *Water quality*, Subcommittee SC 5, *Biological methods*.

Annex A of this International Standard is for information only.

© ISO 1995

All rights reserved. Unless otherwise specified, no part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying and microfilm, without permission in writing from the publisher.

International Organization for Standardization
Case Postale 56 • CH-1211 Geneve 20 • Switzerland

Printed in Switzerland

Water quality — Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*

1 Scope

This International Standard specifies a method for the determination of the toxic effects of chemical compounds on the growth of marine algae.

The method can be used for testing substances which are readily soluble in water and are not significantly degraded or eliminated from the test.

NOTE 1 With minor changes, the method can also be used to determine the inhibitory effects of effluents. See however the note to table 2.

2 Principle

Monospecific algal cells are cultured for several generations in a defined medium containing a range of concentrations of the test substance, prepared by mixing appropriate quantities of nutrient concentrate, seawater, stock solutions of the test substance, and an inoculum of exponentially growing algal cells. The test solutions are incubated for a minimum period of 72 h, during which the cell density in each is measured at intervals of at least every 24 h. Inhibition is measured as a reduction in growth, or growth rate, relative to control cultures grown under identical conditions.

3 Definitions

For the purposes of this International Standard, the following definitions apply.

3.1 cell density: Number of cells per unit volume.

3.2 growth rate: Increase in cell density.

3.3 growth rate: Expression of rate of increase in cell density with respect to time.

See 8.2.2.

3.4 test solution: Mixture of seawater, nutrients and test substance in which algal cells are incubated.

3.5 control: Mixture of seawater, nutrients and algal cells without test substance.

3.6 effective concentration, EC10 or EC50: The concentration of test substance which results in respectively a 10 % or 50 % reduction in either growth or growth rate relative to the controls.

3.7 no observed effect concentration, NOEC: The highest concentration tested at which there is no statistically significant reduction of growth or growth rate relative to the controls.

4 Materials

4.1 Test organisms

Use either of the following marine algae.

a) *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (CCAP 1077/1C, NIVA BAC 1, ISTPM P4 — Bouin).

or

b) *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (CCAP 1052/1A — Oban, 1090/1A Göttingen, NIVA BAC 2, ISTPM P1).

These algae are important and widely distributed planktonic phytoplankton species (phylum *Bacillariophyta*) in estuarine and coastal areas.

The strains recommended are available in unialgal non-axenic cultures from the following sources:

NIVA: Norwegian Institute for Water Research
P.O. Box 173 Kjelsås
N-0411 Oslo
Norway

ISTPM P1
ISTPM P4 —

Bouin: INERIS
9, rue de Rocroy
75010 Paris
France

CCAP: Dunstaffnage Marine Laboratory
P.O. Box 3 Oban
Argyll PA34 4AD
United Kingdom

Göttingen: Collection of Algal Cultures
Institute of Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
Germany

NOTE 2 Stock cultures may be maintained in the medium (see 4.3 and 6.1). Regular subculturing is necessary. Weekly intervals may be necessary for *Skeletonema*; every two or three weeks may be sufficient for *Phaeodactylum*.

4.2 Water

All water used in the preparation of the synthetic seawater, nutrient medium and test substance solutions shall be deionized or of equivalent purity. Take special care to avoid contamination of the water by inorganic or organic substances during preparation and storage. Equipment made of copper shall not be used.

4.3 Seawater

For culturing and testing *Phaeodactylum*, the medium (6.1) is made up by adding nutrients to either natural or synthetic seawater. For *Skeletonema*, the use of natural seawater is necessary for the long-term maintenance of cultures, and may also be necessary for the test medium because a synthetic seawater medium may not always support sufficient growth to meet the test quality criteria. If natural seawater [of salinity 30 ‰ (m/m) ± 5 ‰ (m/m)] is used, care shall be taken to ensure that it is not polluted.

Prepare synthetic seawater with the composition given in table 1.

All the chemicals used shall be of analytical grade.

Table 1 — Synthetic seawater

Salt	Concentration of salt in synthetic seawater g/l
NaCl	22
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄ (anhydrous)	3,7
CaCl ₂ (anhydrous)	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
Salts of H ₃ BO ₃	0,023

Sterilize the seawater by membrane filtration (5.4).

4.4 Nutrients

Prepare three nutrient stock solutions in water, with the compositions given in table 2.

Table 2 — Nutrient stock solutions

Nutrient	Concentration in stock solution	Final concentration in test solution
Stock solution 1		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	48 mg/l	149 µg/l (Fe)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	144 mg/l	605 µg/l (Mn)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	45 mg/l	150 µg/l (Zn)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,157 mg/l	0,6 µg/l (Cu)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,404 mg/l	1,5 µg/l (Co)
H ₃ BO ₃	1 140 mg/l	17,1 µg/l
Na ₂ EDTA 1)	1 000 mg/l	15,0 µg/l
Stock solution 2		
Thiamin hydrochloride	50 mg/l	25 µg/l
Biotin	0,01 mg/l	0,005 µg/l
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	0,10 mg/l	0,05 µg/l
Stock solution 3		
K ₃ PO ₄	3,0 g/l	3,0 mg/l
NaNO ₃	50,0 g/l	50,0 mg/l
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	14,9 g/l	14,9 mg/l
1) Complexing of heavy metals by the relatively high concentration of EDTA present in the nutrient medium may preclude the testing of effluents containing heavy metals.		

NOTE 3 These stock solutions will eventually be diluted (see 6.1) to obtain the final nutrient concentrations in the test solutions.

All the chemicals used shall be of analytical grade.

Sterilize stock solutions 1 and 3 by autoclaving at 120 °C for at least 15 min, and stock solution 2 by membrane filtration (5.4).

Store the solutions in the dark at 4 °C.

5 Apparatus

All equipment which will come into contact with the test medium shall be made of glass or a chemically inert material.

Normal laboratory apparatus and

5.1 Temperature-controlled cabinet or room, with a white fluorescent light providing continuous even illumination, suitable for the lighting requirements specified for the test in 6.6.

5.2 Apparatus for measuring algal cell density, preferably a particle counter, or a microscope with a counting chamber. Alternatively, determine the state of growth of the algal cultures by an indirect procedure using a spectrometer, turbidimeter or fluorimeter, when sufficiently sensitive and if shown to be sufficiently well correlated with the cell density. The apparatus used shall be capable of accurately measuring cell densities as low as 10^4 cells per millilitre and to distinguish between algal growth and disturbing effects, for example the presence of particulate matter and colour of the sample.

5.3 Culture flasks, for example conical flasks of capacity 250 ml, with air-permeable stoppers.

5.4 Apparatus for membrane filtration, with filters of mean pore diameter 0,2 µm.

5.5 Autoclave.

5.6 pH-meter.

6 Procedure

6.1 Preparation of culture medium

Add 15 ml of nutrient stock solution 1, 0,5 ml of nutrient stock solution 2 and 1 ml of nutrient stock solution 3 (see table 2) to approximately 900 ml of natural or synthetic seawater (4.3) and then make up to 1 litre with the same seawater.

Adjust the pH to $8,0 \pm 0,2$ by adding dilute hydrochloric acid or sodium hydroxide solution.

6.2 Preparation of inoculum

The algal inoculum for the test shall be taken from an exponentially growing pre-culture. The pre-culture shall be set up $3 \text{ d} \pm 1 \text{ d}$ before the start of the test, as follows.

Add sufficient cells from the algal stock culture to the culture medium (6.1) to obtain an initial cell density of approximately 2×10^3 to 10^4 cells per millilitre. Maintain the pre-culture under the same conditions as those in the test (see 6.6) for $3 \text{ d} \pm 1 \text{ d}$. After this, the pre-culture should be in exponential growth and of sufficient cell density to be used as an inoculum for the test. Measure the cell density in the pre-culture immediately before use (see 6.7), in order to calculate the required inoculum volume.

6.3 Choice of test concentrations

The concentrations of substance to be tested shall normally follow a geometric progression, for example 10 mg/l; 3,2 mg/l; 1,0 mg/l; 0,32 mg/l; ...; 0,01 mg/l.

If possible, the concentrations shall be chosen to obtain several (i.e. 4 or 5) levels of inhibition of growth ranging from less than 10 % to greater than 90 %.

NOTE 4 A suitable concentration range is best determined by carrying out a preliminary range-finding test covering several orders of magnitude of difference between test concentrations. Replication of test concentrations is unnecessary during this preliminary test.

6.4 Preparation of test substance stock solution

Prepare stock solutions of the test substance, where necessary, in the algal growth medium by dilution. The concentration of test substance in the stock solutions shall be such that, when added to the test vessels containing growth medium inoculated with the algae, the intended range of test concentrations is obtained.

Normally, the test shall be carried out without adjusting the pH. However, some substances may exert a toxic effect due to extreme acidity or alkalinity. In order to determine the toxicity of a substance independent of pH, adjust the pH of the master stock solution (before the dilution in series) to that of the culture medium, using either 1 mol/l hydrochloric acid or 1 mol/l sodium hydroxide solution.

6.5 Preparation of test solutions

Prepare the test solutions by mixing the appropriate volumes of test substance stock solutions (6.4), cul-

ture medium (6.1) and inoculum (6.2) in the test vessels. The total volume shall be the same in all the vessels.

The amount of inoculum added to all the vessels shall be sufficient to give an initial cell density in the test solutions of 10^4 cells per millilitre.

A lower initial cell density (3 to 5-fold lower) is recommended for *Skeletonema* due to its higher cell volume. The chain-formation of *Skeletonema* shall be taken into account when determining the initial cell density.

Prepare three replicates for each test substance concentration. To a further six vessels, add only culture medium and inoculum, with no test substance. These vessels serve as controls.

Prepare a single concentration series of the test substance without algae to serve as a background for the cell density determinations.

If there is sufficient technical justification, the test design may be altered to increase the number of concentrations and reduce the number of replicates per concentration.

Measure the pH of samples of each concentration of the test solution and of the controls.

6.6 Incubation $26-44 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$

Incubate the stoppered test vessels at a nominal temperature of 20°C , under continuous white light. The temperature shall not vary by more than 2°C during the test. The light intensity at the average level of the test solutions shall be uniform and in the range $60 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ to $120 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ [35×10^{18} photons/ $(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ to 70×10^{18} photons/ $(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], when measured in the photosynthetically effective wavelength range of 400 nm to 700 nm using an appropriate receptor.

It is important to note that the method of measurement, and in particular the type of receptor (collector), will affect the measured value. Spherical receptors (which respond to direct and reflected light from all angles above and below the plane of measurement) and "cosine" receptors (which respond to light from all angles above the measurement plane) are preferred to unidirectional receptors and will give higher readings for a multi-point light source of the type described in note 5.

NOTES

5 The light intensity specified in this subclause could be obtained using 4 W to 7,30 W fluorescent lamps of the universal white (natural) type [i.e. a rated colour of standard colour 2 (a colour temperature of 4 300 K) according to IEC 81[1]] at a distance of approximately 0,35 m from the algal culture medium.

6 For light-measuring instruments calibrated in lux, an equivalent range of 6 000 lx to 10 000 lx is acceptable for the test.

Keep the algal cells in suspension by shaking, stirring or aerating, in order to improve gas exchange and reduce pH variation in the test solutions.

6.7 Measurements

Measure the cell density in each test vessel (including the controls) at least every 24 h. These measurements are usually made on small volumes (e.g. 5 ml), which are removed from the test solution and not replaced.

The test shall last for at least 72 h. At the end of the test, measure the pH of samples of each concentration of the test solution (6.5) and of the controls (6.5).

7 Validity criteria

Consider the test invalid if the following conditions are not met.

- a) The control cell density shall have increased by a factor of more than 16 in 72 h. This increase corresponds to a growth rate (8.2.2) of 0,04/h.

NOTE 7 The control growth rates determined in the interlaboratory test were as follows:

Skeletonema costatum: $0,10/\text{h} \pm 0,02/\text{h}$;

Phaeodactylum tricorutum: $0,072/\text{h} \pm 0,007/\text{h}$.

In the interlaboratory test, outlier results were consistently found in tests having a control growth rate of $< 0,06/\text{h}$.

- b) The control pH shall not have varied by more than $\pm 1,0$ unit during the test.

NOTE 8 Variations in pH during the test can have a significant influence on the results and therefore a limit of $\pm 1,0$ unit is set. These variations, however, should always be kept as low as possible, for example by performing continuous shaking during the test.

8 Expression of results

8.1 Plotting growth curves

Tabulate the cell density measurements, or other parameters correlated with cell density in the test culture, according to the concentration of test substance and the time of measurement.

Plot a growth curve for each test concentration and control, as a graph of the logarithm of the mean cell density against time.

8.2 Calculation of percentage inhibition

Base the assessment of the inhibition of growth in the test on the area under the growth curve (8.2.1) and the growth rate (8.2.2). Calculate for the period during which growth is considered to be exponential in the control cultures [indicated as the linear part of the logarithmic plot of the growth curve (8.1)].

8.2.1 Area under the growth curve (biomass integral)

Calculate the area, A , under the double-linear growth curve (not the logarithmic growth curve) for each test culture separately, from the equation

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

where

- t_1 is the time, in hours, between the first measurement and the beginning of the test;
- t_2 is the time, in hours, between the second measurement and the beginning of the test;
- t_{n-1} is the time, in hours, between the $(n-1)$ th measurement and the beginning of the test;
- t_n is the time, in hours, between the n th measurement and the beginning of the test;
- N_0 is the nominal initial cell density (see note 9);
- N_i is the measured cell density at time t_i ;

N_2 is the measured cell density at time t_2 ;

N_{n-1} is the measured cell density at time t_{n-1} ;

N_n is the measured cell density at time t_n .

NOTE 9 Cell density is expressed as cells per millilitre another appropriate unit dependent on the method used (5.2).

Calculate mean values of A for each test concentration and control. From these values, calculate the percentage inhibition for each test concentration from the equation

$$I_{Ai} = \frac{\bar{A}_c - \bar{A}_i}{\bar{A}_c} \times 100$$

where

I_{Ai} is the percentage inhibition (area) for test concentration i ;

\bar{A}_i is the mean area for test concentration i ;

\bar{A}_c is the mean area for the control.

8.2.2 Growth rate

Calculate the growth rate, μ , per hour, for each test culture, from the equation

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t_L}$$

where

t_L is the time, in hours, between the last measurement of the exponential growth period (8.2) and the beginning of the test;

N_0 is the nominal initial cell density (see note 9);

N_L is the measured cell density at time t_L .

Alternatively, determine the growth rate from the slope of the regression line in a plot of the logarithm of the mean cell density against time (8.1).

Calculate mean values of μ for each test concentration and control. From these values, calculate the percentage inhibition for each test concentration, from the equation

$$I_{\mu i} = \frac{\bar{\mu}_c - \bar{\mu}_i}{\bar{\mu}_c} \times 100$$

where

$I_{\mu i}$ is the percentage inhibition (growth rate) for test concentration i ;

$\bar{\mu}_i$ is the mean growth rate for test concentration i ;

$\bar{\mu}_c$ is the mean growth rate for the control.

8.3 Determination of EC10 and EC50

Tabulate values of $I_{\mu i}$ or I_{A_i} against the corresponding test concentrations, and plot these values on semi-logarithmic or logarithmic-probit paper (with test concentrations on the logarithmic scale) as appropriate. Fit a line to the data by eye and read the EC50 (the test concentration corresponding to 50 % inhibition) and EC10 (the test concentration corresponding to 10 % inhibition) from this graph.

Alternatively, calculate the EC10 and EC50 values by a regression analysis technique (for example see [2] and [3] in annex A).

8.4 Determination of NOEC

Determine the NOEC as the highest tested concentration at which no significant inhibition of growth is observed relative to the control.

9 Denotation of results

Denote EC10 and EC50 values based on growth curve area (biomass integral) as $EC10_b$ and $EC50_b$ and those based on growth rate as $EC10_r$ and $EC50_r$. Denote NOEC values as $NOEC_b$ for values based on growth curve areas, or $NOEC_r$ for values based on growth rate. Also indicate clearly the time span used for the determination, for example $EC50_b$ (0-72 h). Quote EC10, EC50 and NOEC values to two significant digits, normally in milligrams per litre.

10 Interpretation of results

EC10, EC50 and NOEC values are toxicological data derived from a laboratory experiment carried out under defined standard conditions. They give an indication of potential hazards, but cannot be used directly to predict effects in the natural environment. When interpreting EC10, EC50 and NOEC values, take into consideration the shape of the growth curves. Certain features of these curves (for example, delayed onset of growth; good initial growth that is not sustained) can help to indicate the mode of action of the toxic substance concerned.

11 Reproducibility

An interlaboratory test based on the test described in this International Standard was carried out by 10 laboratories in 1989/1990. The results obtained with the reference substances potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) and 3,5-dichlorophenol ($Cl_2C_6H_3OH$) and the strains ISTPM/BAC/CCAP (1077/1C and 1052/1B) are shown in table 3.

12 Test report

The test report shall include the following information:

- a) a reference to this International Standard;
- b) test substance: chemical identification data;
- c) test organism: species, origin, strain number method of cultivation;
- d) test details:
 - start date and duration,
 - concentrations tested,
 - composition of medium,
 - culturing apparatus and incubation procedure,
 - light intensity and quality,
 - temperature,
 - pH of test solutions at the start and end of the test,
 - method for measuring cell density;
- e) results:
 - cell density in each test vessel at each measuring point,
 - mean cell density for each test concentration (and control) at each measuring point,
 - growth curves (logarithm of cell density against time),
 - relationship between concentration and effect (percentage inhibition values against concentration) in table or graphical representation; for example, percentage inhibition on probit-scaled ordinate against concentration on logarithmic-scaled abscissa,

- EC10 values and method of determination,
- EC50 values and method of determination,

- NOEC values and method of determination,
- other observed effects.

Table 3 — Interlaboratory test results

Test organism and test substance	Participants	Outliers	Parameter	Mean value mg/l	Standard deviation mg/l	Coefficient of variation %
<i>Skeletonema costatum</i>						
Potassium dichromate	9	2	EC50 _r	2,5	1,1	44
	9	2	EC50 _b	2,1	0,8	37
3,5-dichlorophenol	7	2	EC50 _r	1,6	0,3	18
			EC50 _b	1,3	0,1	7
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>						
Potassium dichromate	10	3	EC50 _r	20,1	5,3	26
			EC50 _b	6,0	1,8	31
3,5-dichlorophenol	10	3	EC50 _r	2,7	0,2	8,6
			EC50 _b	1,5	0,3	20

Annex A
(informative)

Bibliography

- [1] IEC 81:1984, *Tubular fluorescent lamps for general lighting service*.
- [2] KOOIJMAN, S.A.L.M., HANSTVEIT, A.O. and OLDERSMA, H. Parametric analysis of population growth in bioassays, *Water Research* **17** (1983), pp. 527-538.
- [3] NYHOLM, N., SØRENSEN, P.S., KUSK, K.O. and CHRISTENSEN, E.R. Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Tox. Chem.* **11** (1992), pp. 157-167.

