

Laboratorium 5 i 6

Testy toksykologiczne

Zadanie 1. Szybki test na bakteriach

Materiały:

zawiesina *Escherichia coli*
zawiesina *Pseudomonas fluorescens*
agar odżywczy na płytkach Petriego
pipety ze sterylnymi końcówkami (0,1 cm³ i 10 µl)
głaszczki
sterylne pęsety
sterylne krążki bibułowe o średnicy 5 mm
linijki albo papier milimetrowy
4 połowicze roztwory substancji badanej
roztwór fizjologiczny NaCl

Wykonanie:

W dniu rozpoczęcia eksperymentu:

1. Agar odżywczy na płytce Petriego zaszczerpić sterylnie 0,1 cm³ zawiesiny (na środek płytki). Zaszczep rozprowadzić po powierzchni agaru sterylną głaszczką. Drugą zawiesiną zaszczerpić kolejną płytkę z agarem.
2. Wieczko każdej z płytek podpisać nazwą gatunkową (ew. rodzajową) bakterii oraz nazwą grupy ćwiczeniowej i zespołu wykonującego zadanie (ew. inicjałami osoby wykonującej).
3. Sterylne krążki nasączyć za pomocą pipety (po 0,1 cm³) badanymi roztworami oraz roztworem kontrolnym, a następnie odsączyć nadmiar płynu za pomocą sterylnej bibuły.
4. Krążki ułożyć na pożywce sterylną pensetą (od kontroli do najwyższego stężenia). Krążki należy rozmieścić z zachowaniem jednakowych i możliwie największych odległości pomiędzy krążkami oraz pomiędzy nimi a pionową ścianką płytki.
5. Na spodzie płytki (nie na wieczku!) podpisać krążki bibułowe nazwą i stężeniem badanej substancji (można zastosować skrót).

6. Płytkę z *Escherichia coli* inkubować przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Płytkę z *Pseudomonas fluorescens* inkubować przez 72 godziny w temperaturze 22°C. Po zakończeniu inkubacji płytki przechowywać w lodówce do kolejnych zajęć.

W dniu odczytów:

1. Zmierzyć średnicę strefy hamowania wzrostu wokół każdego z krążków z badaną substancją.
2. Na tablicy sporządzić zestawienie wyników uzyskanych przez wszystkie zespoły w grupie laboratoryjnej. Wyniki poszczególnych zespołów potraktować jako powtórzenia tego samego eksperymentu.
3. Obliczyć wartości średnie dla poszczególnych powtórzeń.
4. Wyniki doświadczenia (wartości średnie) zestawić w tabeli.
5. Wyciągnąć wniosek z eksperymentu. Czy badana substancja jest toksyczna dla *Pseudomonas fluorescens* i *Escherichia coli*? Która z nich jest bardziej wrażliwa na toksyczne działanie badanej substancji?

Zadanie 2. Test letalny na rozwielitkach i obliczanie LC₅₀

Materiały:

insektycyd Pro Agro 125 SL
Roundup
woda do rozcieńczeń
4-5-cio dniowe rozwielitki *Daphnia magna*
płytki Petriego / płytki 6-dołkowe.

Wykonanie:

1. Sporządzić szereg 5 rozcieńczeń połowicznych badanych substancji:
 - a. Pro Agro 125 SL: 0,030%, 0,015%, 0,0075%, 0,0038%, 0,0019%;
 - b. Roundup: 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,0125%.
2. Płytki /dołki podpisać stężeniem badanej substancji oraz jej nazwą.

3. Do dołków płytki 6-cio dołkowej dodać po 10 cm³ poszczególnych rozcieńczeń badanych substancji, wody do rozcieńczeń do jednego dołka (kontrola).
4. Do każdej z płytek/dołków przenieść po 10 rozwielitek. Należy robić to tak, by nie uszkodzić rozwielitek i nie zanieczyścić hodowli macierzystej badaną substancją.
5. Po 10, 20, 30 i 40 minutach policzyć osobniki żywe i martwe (za kryterium przyjąć ruch lub jego brak).
6. Na tablicy sporządzić zestawienie wyników uzyskanych przez wszystkie zespoły w grupie laboratoryjnej (wzór tabeli przy opisie obliczania LC₅₀ metodą Reeda). Wyniki poszczególnych zespołów potraktować jako powtórzenia tego samego eksperymentu.
7. Obliczyć LC₅₀ dla poszczególnych czasów ekspozycji metodą skumulowaną Reeda. Wykorzystać wszystkie wyniki w grupie uzyskane dla tej samej substancji badanej.

Obliczanie LC₅₀ metodą Reeda

Metoda Reeda opiera się na założeniu, że jeżeli badane zwierzęta przeżyły ekspozycję na pewne stężenie to przeżyją również w stężeniu niższym i odwrotnie, jeżeli padły przy pewnym stężeniu to padną również przy stężeniu wyższym. Dodając (kumulując) liczbę zwierząt martwych, żywych i badanych można obliczyć tzw. skumulowany procent śmiertelności P.

Tab. 1. Przykładowe zestawienie wyników do obliczenia LC₅₀ metodą Reeda

badane stężenie mg/dm ³	liczba zwierząt		liczba zwierząt po skumulowaniu			procent śmiertelność P=m•100/b
	martwych	żywych	martwych	żywych	badanych	
1,0	2	8	2	10	12	16.6
2,0	8	2	10	2	12	83.33
4,0	10	0	20	0	20	100

Wyznaczyć LC₅₀ korzystając ze wzoru:

$$\log LC_{50} = \log x + k \cdot \log i$$

gdzie:

$$k = (50 - P_1) / (P_2 - P_1)$$

x - stężenie wywołujące najbliższe niższe niż 50% śmiertelności

i - iloraz postępu geometrycznego (1.1 ... 2.0)

k - współczynnik odchylenia

P1 - skumulowany % śmiertelności niższy od 50%

P2 - skumulowany % śmiertelności wyższy od 50%

Zadanie 3. Test na rzęsie.

Materiały:

płytki 6-cio dołkowe

rzęsa drobna

Roundap

woda do rozcieńczeń

cylindry miarowe

butelki laboratoryjne albo zlewki do przygotowania rozcieńczeń

Wykonanie:

W dniu rozpoczęcia eksperymentu:

1. Przygotować 5 połowicznych rozcieńczeń Roundapu (10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%) w wodzie do rozcieńczeń (woda z akwarium albo odstana woda wodociągowa), tak aby po wprowadzeniu do podłoża hodowlanego dały żądane ostateczne stężenie.
2. Do 5 dołków płytki 6-cio dołkowej dodać po 10 cm³ substancji badanej (do każdego dołka inne stężenie). Dołki opisać stężeniami na dnie płytki. Na wieczku opisać płytkę nazwą substancji badanej oraz nazwą grupy laboratoryjnej i zespołu wykonującego zadanie)
3. Roztwór w każdym dołku zaszcześcić 10 trójczłonowymi osobnikami rzęsy. Rzęsę przenosić eż, w taki sposób, by nie uszkodzić roślin i nie zanieczyścić hodowli macierzystej substancją badaną
4. Rzęsę inkubować 7 dni w termoluminostacie.

W dniu odczytów:

1. Policzyc osobniki w poszczególnych dołkach. Zaobserwować i opisać zmiany morfologiczne. Odnotować charakter i stopień zmian (np. ocenić jakiej części powierzchni członów one dotyczą). Sporządzić dokumentację fotograficzną.
2. Na tablicy sporządzić zestawienie wyników uzyskanych przez wszystkie zespoły w grupie laboratoryjnej. Wyniki poszczególnych zespołów potraktować jako powtórzenia tego samego eksperymentu.
3. Obliczyć średnie liczby osobników dla poszczególnych powtórzeń.
4. Wyniki doświadczenia (wartości średnie i opis stwierdzonych uszkodzeń) zestawić w tabeli.
5. Wyciągnąć wniosek z eksperymentu. Czy badana substancja jest toksyczna dla rzęsy?

Zadanie 4. Test na glonach

Materiały:

płynna hodowla glonów *Chlorella*
pożywka dla glonów Jankowskiego albo Uspieńskiego
algicyd Bros aqua na glony
probówki
płytki 24-dołkowe
komory Fuchsa-Rosenthala
szkiełka nakrywkowe
pipety
bibuła

Wykonanie:

W dniu rozpoczęcia eksperymentu:

1. Przygotować szereg 5 rozcieńczeń Bros aqua na glony (0,04%, 0,004%, 0,0004%, 0,00004%, 0,000004% w pożywce Jankowskiego albo Uspieńskiego (po 5 cm³).
2. Na spodzie płytki dołki podpisać stężeniem badanej substancji. Na wieczku płytkę podpisać nazwą badanej substancji oraz nazwą grupy laboratoryjnej i zespołu wykonującego zadanie. W przypadku wykorzystywania jednej płytki przez dwa lub więcej zespołów ich oznaczenie wpisać w sposób umożliwiający przyporządkowanie

wykorzystanych dołków poszczególnym zespołom.

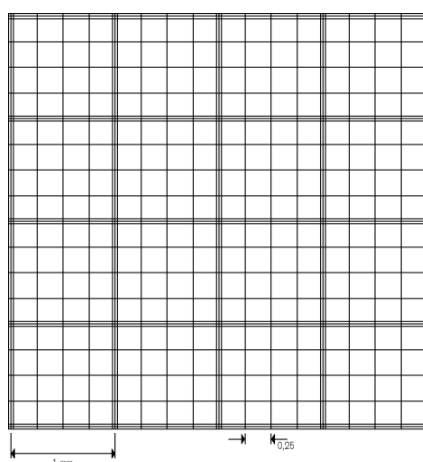
3. Zawiesinę glonów zamieszać. Do 6 dołków płytki 24 dołkowej dodać pipetą po 1 cm^3 zawiesiny. W tym czasie należy mieszać zawiesinę, tak by komórki glonów nie opadały na dno, a ich rozmieszczenie w pożywce było możliwie jednakowe. W przeciwnym razie zaszczepy w poszczególnych dołkach, mimo jednakowej objętości będą znacząco różnić się liczbą komórek glonów.
4. Do pierwszego z zaszczepionych dołków dodać 1 cm^3 pożywki dla glonów bez badanej substancji (kontrola). Do pozostałych 5 dołków dodać po 1 cm^3 kolejnych rozcieńczeń badanej substancji.
5. Płytkę z glonami inkubować przez tydzień w termoluminostacie.
6. Określić liczbę komórek glonów na jednostkę objętości płynu hodowlanego uzyskaną w płynach hodowlanych w dołkach z poszczególnymi rozcieńczeniami badanej substancji oraz w dołku kontrolnym. Zakładając, że udało się uzyskać jednakowe zaszczepy we wszystkich 6 dołkach, wystarczy określić zagęszczenie komórek w jednym z nich albo w zawieszynie wyjściowej. Zagęszczenie komórek w zawieszynie wyjściowej powinno być dwukrotnie wyższe niż w poszczególnych dołkach, do których dodano równe objętości zawiesiny i badanego roztworu (patrz opis i instrukcja posługiwania się komorą Fuchsa-Rosenthala).

W dniu odczytów:

1. Określić liczbę komórek glonów na jednostkę objętości płynu hodowlanego w każdym z 6 dołków płytki 24-dołkowej (patrz opis i instrukcja posługiwania się komorą Fuchsa-Rosenthala).
2. Wyniki wszystkich zespołów w grupie zebrać na tablicy, traktując je jako powtórzenia jednego eksperymentu. W zestawieniu uwzględnić wartości początkowe sprzed tygodnia.
3. Obliczyć wartości średnie dla powtarzających się wyników oraz średnie zmiany gęstości komórek w ciągu tygodnia.
4. Wyniki (wartości średnie) zestawić w tabeli
5. Wyciągnąć wnioski. Czy badana substancja wykazuje działanie toksyczne wobec *Chlorella*?

Opis i instrukcja posługiwania się komorą Fuchsa-Rosenthala

Komorą Fuchsa-Rosenthala służy do liczenia komórek pod mikroskopem. Została ona zaprojektowana, by umożliwić wykonywanie morfologii krwi metodą manualną. Jest ona grubym szkiełkiem podstawowym, na którym wyszlifowano dwa kwadraty. Każdy z nich podzielony jest na 16 dużych kwadratów oddzielonych od siebie potrójną linią. Każdy z dużych kwadratów podzielony jest na 16 małych kwadratów oddzielonych od siebie linią pojedynczą. Pola, na których wyszlifowano kwadraty ograniczone są bruzdami. Objętość między szkiełkiem nakrywkowym a podstawowym nad powierzchnią całego kwadratu (podzielonego na 16 dużych kwadratów) wynosi $3,2 \text{ mm}^3$.



Ryc. 1. Kwadrat komory Fuchsa-Rosenthala. Źródło:

http://www.farmacja.cm.uj.edu.pl/documents/41668/114696386/OAMIII%20zdm_PMR.pdf

Instrukcja posługiwania się komorą:

1. Rozcieńczyć badaną zawiesinę komórek, jeśli to konieczne.
2. Komorę przykryć szkiełkiem nakrywkowym o wymiarach dostosowanych do wymiarów komory.
3. Do bruzdy pomiędzy dużymi kwadratami wprowadzić pipetą badaną zawiesinę komórek.
4. Policzyc wszystkie komórki w 8 dużych, losowo wybranych, kwadratach. Uwzględnić komórki znajdujące się na górnej i lewej granicy kwadratu. Pominąć komórki znajdujące się na prawej i dolnej granicy kwadratu.
5. Liczbę komórek w 1 cm^3 obliczyć wg wzoru:

$$X = (a \cdot 2) \cdot 1000 / 3,2 \cdot R$$

gdzie:

x – liczba komórek / ml,

a – liczba komórek policzonych w 8 kwadratach,

1000 – liczba, która sprowadza wartość do objętości 1 cm³, (1 cm³ = 1000 mm³)

3,2 mm³ - wewnętrzna objętość komory,

R - rozcieńczenie