



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Ökotoxikológiai módszerek vízi tesztorganizmusokkal

Környezettoxikológia
Laboratóriumi gyakorlat

2013

Mérésvezető: Kunglné Nagy Zsuzsanna

1. A gyakorlat célja

A tanszéken található vízi tesztorganizmusokkal és az őket alkalmazó környezettoxikológiai tesztekkel való megismerkedés. Fény- illetve sztereomikroszkóp segítségével tanulmányozzuk három különböző trofikus szintről származó tesztorganizmus tulajdonságait. A gyakorlat második felében a fénymikroszkóppal megismert egysejtű tesztorganizmusokat tartalmazó minta minőségi és mennyiségi vizsgálatát végezzük el. A minőségi azonosítás az élőlények tulajdonságai alapján, a mennyiségi azonosítás Bürker-kamrás számolással történik.

2. A tesztorganizmusok bemutatása

A tesztorganizmusok jellegzetességei, fenntartása, az őket alkalmazó környezettoxikológiai tesztek jellemzői és a mérések kivitelezése az *Ökotoxikológiai módszerek vízi tesztorganizmusokkal, elméleti bevezetés* című dokumentumban található. **Ezt is feltétlen kérjük elolvasni laborgyakorlat előtt!**

3. A gyakorlat menete

3.1. Fénymikroszkópos vizsgálat

Fénymikroszkóppal négy egysejtű tesztorganizmus morfológiai jegyeit tanulmányozzuk:

- ✓ *Chlorella vulgaris* (egysejtű édesvízi alga)
- ✓ *Pseudokirchneriella subcapitata* (egysejtű édesvízi alga)
- ✓ *Scenedesmus subspicatus* (egysejtű édesvízi alga)
- ✓ *Tetrahymena pyriformis* (állati egysejtű)

Fénymikroszkóp bemutatása¹

A mikroszkóp képkalkoló rendszere a tárgylencséből (**objektív**) és a szemlencséből (**okulár**) áll. Az objektív a vizsgálandó tárgyról nagyított, fordított állású képet képez, majd az okulár erről a közbenső képről nagyított egyenes állású virtuális képet képez. A mikroszkóp optikai részekből és az ezeket összefoglaló mechanikai részekből áll.

A mikroszkóp mechanikai részei a következők:

- ✓ állvány
- ✓ tárgyasztal
- ✓ revolver
- ✓ tubus
- ✓ durva- és finombeállító csavarrendszer

A mikroszkóp állvány része az optikai részek rezgésmentes összetartásáért felelős, valamint biztosítja, hogy azok közös optikai tengelyen legyenek. A tárgyasztal az optikai tengelyre merőleges lap, közepén kör-alakú nyílással. A tárgyasztal a vízszintes síkban elmozgatható x és y irányba. A tubus és a revolver tartja az okulár és objektív

¹ Dr. Erdélyi Anna, Dr. Gruiz Katalin, Dr. Janszó Béla, Dr. Pap Géza: Ipari mikrobiológiai gyakorlatok, 1993, Műegyetem Kiadó

lencserendszereket. A tubus emelésével és süllyesztésével állítható be a kép élessége, durva és finom állítócsavarok segítségével. A revolverfej a különböző nagyítású objektíveket tartalmazza. Mivel ez egy koncentrikus tengely körül forog, könnyedén válthatunk nagyítást úgy, hogy egyszerűen egy másik nagyítású objektívet fordítunk a tárgyasztal fölé.

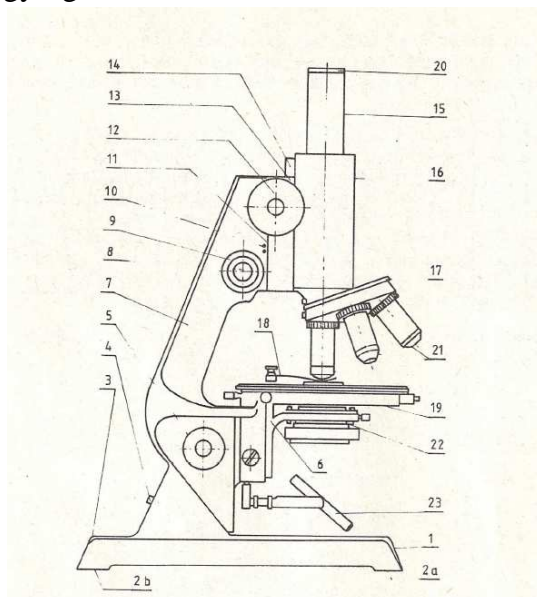
A mikroszkóp optikai részei két csoportra oszthatók:

- ✓ megvilágító rendszer
- ✓ nagyító (képképző) rendszer

A megvilágító rendszer részei:

- ❖ fényforrás (kollektor lencsével és rekesszel)
- ❖ tükör
- ❖ kondenzor (gyűjtőlencserendszer)
- ❖ írisz diafragma

A megvilágító rendszer fényforrása lehet tükör, vagy pontszerű, nagy fényerejű izzó. Egy ún. írisz diafragma segítségével állítható a fényerősség. A tér minden irányában elmozgatható tükör a fényforrás sugarait az optikai tengelybe vetíti. A kondenzorral a megvilágító sugárkúp numerikus aperturáját változtatjuk. A nagyobb nagyítású (és nagyobb numerikus apertúrájú) objektívek által igényelt nagyobb megvilágító apertúrát a kondenzorral biztosítjuk. A kondenzor szerepet játszik a megvilágítás erősségében és a kivilágított tárgysík terület nagyságában.



A mikroszkóp felépítése. 1-3 talp, 4 ütköző a vízszintesre állításhoz, 5 csukló, 6 tárgyasztal tartó, 7 oszlop, 8 finom állítócsavar, 9 beosztás a finom állítócsavaron, 10-11 a finom állítócsavar beállítási határköze, 12 durva állítócsavar, 13 a durva állítócsavar csuszósínje, 14 fogas lécc, 15-16 tubus, 17 objektív revolver, 18 szorítókapocs, 19 tárgyasztal, 20 okulár, 21 objektívek, 22 kondenzor az apertúra rekesszel, 23 tükör

1. ábra: A mikroszkóp felépítése¹

További megtekintésre javasolt képek a Körinfo oldalon találhatóak:
<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/keptar/3233>

Mikroszkópos vizsgálat menete

- 1) Elkészítjük a vizes preparátumot. A mikroszkóp alatt vizsgált tárgyat illetve élőlényt tárgylemezen helyezünk el, folyadékba ágyazzuk és fedőlemezrel fedjük le.
- 2) Beállítjuk a világítást.
- 3) Betesszük a preparátumot a mikroszkópba
- 4) Közel tekerem az objektívet a tárgyasztalhoz
- 5) Belenézek a mikroszkópba
- 6) Tekerem a durva állítócsavart
- 7) Tekerem a finom állítócsavart

A mikroszkóp kép beállításánál az alábbi szabályok veendő figyelembe¹:

- ✓ „Mindig a legkisebb nagyításnál kezdjük a vizsgálatot és fokozatosan váltsunk át nagyobb nagyításokra.”
- ✓ „A kép beállítása minden esetben úgy történik, hogy a durva állítócsavarral közelítjük az objektívet a fedőlemezhez miközben oldalról figyeljük a frontlencse helyzetét. A frontlencse és a fedőlemez közötti távolság élesre állított kép esetén annál kisebb, minél nagyobb az objektív nagyítása. Nagy nagyításoknál az objektív szinte érinti a fedőlemezt. Ha az objektívet lesüllyesztettük a mikroszkópba nézve nagyon lassan emeljük a tubust a durva állítócsavarral. A képet a finom állítócsavarral állítjuk élesre.”
- ✓ „Szigorúan tilos a mikroszkópba tekintve süllyeszteni a tubust.”
- ✓ „A látómezőben a preparátum kis részletét látjuk. Minél nagyobb a nagyítás, annál kisebb ez a terület.”
- ✓ „Kezdő mikroszkópálóknál előfordul, hogy nem a vizsgálandó tárgyat szemlélik. Ha a tárgyasztalt elmozdítjuk és az általunk képnek vélt „tünetemény” nem mozdul el, valószínűleg a kondenzor frontlencsáját állítottuk élesre, vagy az okulár lencséin lévő porszemeket szemléljük.”

3.2. Sztereomikroszkópos vizsgálat

Sztereomikroszkóp segítségével három magasabb szerveződési szinten álló tesztorganizmus tulajdonságait tanulmányozzuk:

- ✓ *Lemna minor* (apró békalencse)
- ✓ *Heterocypris incongruens* (édesvízi kagylósrák)
- ✓ *Daphnia magna* (vízibolha)

Sztereomikroszkóp bemutatása²

A sztereomikroszkóp két objektívvel és két okulárral rendelkezik. Sztereomikroszkóp készíthető két mikroszkóptubus összeépítésével. A két mikroszkóp egyike jobbról, a másik balról nézve képezi le a tárgyat, és így egymástól kissé különböző képek keletkeznek. Az egyik képet az egyik, a másikat a másik szemmel figyelve, a tárgyról térbeli képet kapunk. A sztereomikroszkóp fontos része a képfordító prizmarendszer, mely segítségével a kép egyenes

² Damjanovich Sándor, Fidy Judit, Szöllősi János: Orvosi biofizika, 3. kiadás, 2007, Medicina Kiadó.

állásúvá és oldalhelyessé válik. A sztereomikroszkópot csak kisebb nagyításokra (legfeljebb 100-szoros nagyításig) használjuk, mert nagyobb nagyításkor kicsiny a mélységélesség.

3.3. Ismeretlen minta kvalitatív és kvantitatív vizsgálata

Minden hallgató egyedi mikroba-szuszpenziót tartalmazó mintaszámmal ellátott kémcsövet kap. Első körben a mintában található egysejtű tesztorganizmusok azonosítását kell elvégezni, majd a mintában lévő algasejtek mennyiségét kell meghatározni Bürker-kamra segítségével.

A minta kvalitatív vizsgálata

Az ismeretlen szuszpenzióból vett minta fénymikroszkóppal történő tanulmányozása során a megismert mikromorfológiai jegyek meglétének vagy hiányának számbavételével történik a tesztorganizmusok beazonosítása. A mintában az alább felsoroltak közül lehet 2–4 féle tesztorganizmus:

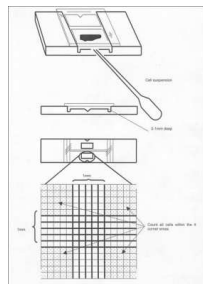
- ✓ *Chlorella vulgaris*
- ✓ *Pseudokirchneriella subcapitata*
- ✓ *Scenedesmus subspicatus*
- ✓ *Tetrahymena pyriformis*

A minta kvantitatív vizsgálata - Bürker-kamrás számolás¹

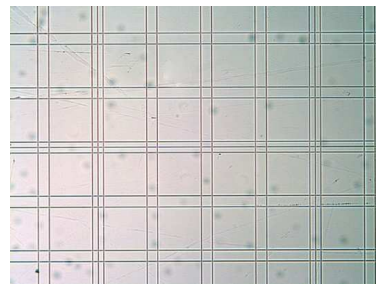
A laborgyakorlat során alkalmazásra kerülő Bürker-kamrás sejtszámolás a számlálókamrás eljárások közé tartozik.

„A számlálókamrák általában különlegesen kiképzett tárgylemezek, amelyeken ismert területű beosztás van. A fedőlemez felvételével meghatározott magasságú réteg keletkezik és így a beosztásban elhelyezkedő folyadék térfogata ismert.

A **Bürker-kamra** két négyzethálós beosztású teret tartalmaz. A kisméretű négyzetek területe $1/400 \text{ mm}^2$, a nagyméretűak területe $1/25 \text{ mm}^2$. Mélységük fedőlemezrel való lefedésénél $0,1 \text{ mm}$. Az 1 milliliterben lévő sejtszámot úgy kapjuk meg, hogy a kisméretű négyzetekhez tartozó átlagos sejtszámot $4 \cdot 10^6$ -nal, a nagy négyzetekhez tartozót pedig $2,5 \cdot 10^5$ -nel szorozzuk. A Bürker-kamra két, egymástól vágjattal elválasztott négyzetes beosztást tartalmaz, így két különböző szuszpenzió vizsgálatára alkalmas. A megszámlálendő négyzeteket a számlálókamra egész felületéről véletlenszerűen választjuk ki. A számlálásnál célszerű következetesen a felső és a jobb oldali határvonalon lévő sejteket a négyzet belsejében lévőkhöz adni.”



2. ábra: Sejtszámolás menete
(<http://www.mokkka.hu/drupal/keptar/3257>)



3. ábra: Bürker-kamra mikroszkópos képe
(<http://dnsafazekben.blog.hu/2011/03/15/sejttenyesztes>)

4. Jegyzőkönyvvel szemben támasztott követelmények:

A leadott jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell az alábbiakat:

- ✓ Gyakorlat célja
- ✓ Felhasznált eszközök
- ✓ Gyakorlat menete
- ✓ Gyakorlat során használt mikroszkópok típusa, nagyítások
- ✓ Vizsgált tesztorganizmusok tulajdonságai – megfigyelések
- ✓ Mintavételi sajátosságok
- ✓ Mintaszám
- ✓ Számolás
- ✓ Véggövetkeztetés

FIGYELEM!

A laborgyakorlat elején beugró zh megírásával győződünk meg a hallgató felkészültségéről. A zh teljesítéséhez szükséges tudnivalók elsajátításához az alább felsorolt anyagok átnézése ajánlott:

- ✓ Ökotoxikológiai módszerek vízi tesztorganizmusokkal gyakorlathoz tartozó elméleti bevezetés
- ✓ Valamint jelen laborgyakorlati leírat