

Program rektora MU na podporu tvůrčí činnosti studentů

Podpora výzkumné činnosti studentů (kategorie E,F)

Závěrečná zpráva o výsledcích projektu

Identifikační kód projektu

2 | 0 | 0 | 7 | 1 | 4 | 3 | 1 | E | 0 | 0 | 0 | 3

Základní údaje	
Kategorie projektu (čl. 2 odst. 1)	E
Navrhovatel (jméno, příjmení, UČO)	Ondřej Adamovský
Kontakt (adresa, telefon, e-mail)	Kamínky 13, 63400 Brno, tel.: 608 / 774 671, e-mail.: ondrej.adamovsky@centrum.cz
Fakulta	Přírodovědecká
Studijní program – obor	Chemie životního prostředí
Název projektu	Bioakumulace cyanotoxinů v potravním řetězci
Akronym	CYANOTOX
Odborný garant – spoluředitel (+UČO)	Doc. Luděk Bláha, PhD.
VŠ – fakulta – pracoviště	Masarykova univerzita – Přírodovědecká fakulta, RECETOX
Kontakt (adresa, telefon, e-mail)	Kamenice 126/3, Brno, 549 491 491
Další spolupracovníci	studenti-počet : zaměstnanci-počet: 1

Výstupy projektu

Uveďte konkrétní výstupy (publikace, přednášky a postery na konferencích, patentové přihlášky, apod.) a porovnejte s plánovanými výstupy návrhu projektu. Komentujte případný nesoulad.

- Závěrečná zpráva projektu shrnující řešerši problematiky, kompletní data, podrobnou analýzu a interpretaci výsledků (viz.příloha I)
- Prezentace na mezinárodní konferenci
Přednáška na konferenci ROYAL SOCIETY WORKSHOP IN ACCRA GHANA- . *Analysis of microcystins in different matrices ; Microcystin kinetics (bioaccumulation, elimination) and biochemical responses in common carp and silver carp exposed to toxic cyanobacterial blooms.*

28.7. – 1.8. 2008, Accra, Ghana
- Postup i výsledek optimalizace budou spolu se získanými daty z měření koncentrace MCs ve vodách ČR uveřejněny v zahraničním časopise

(například: Analytical and bioanalytical chemistry).

- SOP (standardní operační postup) nové metody rozšiřující sadu stanovení cyanotoxinů se zaměřením na microcystiny; využitelné ostatními studenty v dalších studiích (příloha I.);

V původním návrhu projektu jsme plánovali nově zavedenou metodu použít v experimentu s akumulací microcystinů v rybách, nicméně naše studie ukázala, že je tato metoda méně vhodná pro složitou matici tkání ryb. Proto jsme v tomto experimentu použili jinou metodu detekce (LC-MS). Detaily s argumentací jsou v příloze I.

Odborná charakteristika dosažených výsledků

Stručně charakterizujte dosažené výsledky z hlediska problematiky oboru a jejího řešení na pracovišti, kde nacházíte zázemí při řešení projektu.

Cílem projektu byla optimalizace a zavedení nové imunoanalytické metody, která by byla schopna stanovit velmi nízké koncentrace sinicových toxinů – microcystinů. Tyto látky se běžně vyskytují ve vodách ČR a to zejména během masivního rozvoje sinic. Metoda stanovení všech microcystinů ve vzorku byla z literárních zdrojů navrhována a později sérií experimentů optimalizována. Základ této metody spočívá ve využití protilátek (AD4G2) které jsou speciálně připraveny proti obecné struktuře microcystinů (specifické aminokyselině Adda). Tato protilátka je komerčně dostupná a pro toto použití ideální. Výjimečnost této metody spočívá ve stanovení sumy všech kongenerů microcystinů, kterých existuje celkem devadesát a také dalšího toxinu nodularinu, který rovněž patří do skupiny cyklických peptidů. Běžně používaná metoda používající protilátku proti jednomu z microcystinů to microcystinu-LR(MC10E7) detekuje pouze ty microcystiny které mají ve své struktuře 4-arginin. Ostatní microcystiny nedetekuje vůbec nebo jen v nepatrném množství (malá křížová reaktivita).

Dílčím cílem bylo zavedení této metody do stanovení microcystinů v bioakumulačním experimentu s různými druhy ryb ve spolupráce z Mendlovou zemědělskou univerzitou. Při pokusném stanovení microcystinů ve tkáních ryb se ukázalo, že tato metoda je pro stanovení ve tkáních málo použitelná z důvodů nespécifických vazeb jiných látek než microcystinů na protilátku (detaily shrnuje příloha I.). Pro stanovení v takto složitých maticích se ukázala vhodnější metoda kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou koncovkou, která je nově k dispozici na pracovišti RECETOX. Naše nově vyvinutá a optimalizovaná metoda Anti-Adda je však velmi dobře použitelná pro stanovení celkového obsahu prioritních toxických látek produkovaných sinicemi v jiných maticích (npř. ve vodách) jako suma všech známých forem microcystinů.

Pro hodnocení toxicity vod a souvisejících zdravotních rizik jak pro člověka tak pro

nehummání druhy, je nezbytné znát koncentrace všech kongenerů microcystinů. Ostatní běžně použitelné metody mají buď několika řádově vyšší detekční limit (HPLC-UV), nebo dokáží měřit pouze pár vybraných kongenerů (Anti-MC-LR ELISA). Většina těchto metod musí k analýze používat zakoncentrování vzorků pomocí metody extrakce na pevné fázi – SPE. Naše nově připravená ELISA metoda má velmi nízký detekční limit (0,125 µg/l), takže ji lze úspěšně používat přímo na vzorky z prostředí.

V rámci projektu bylo s využitím nové metodiky změřeno několik vybraných nádrží v České republice na obsah microcystinů. Vzorky z nádrží byly odebrány během letní sezóny 2007 a byly analyzovány na obsah microcystinů ve vodách i biomase sinic. Jedná se o nádrže které mají jak rekreační charakter tak i charakter zdroje pitné vody. Informace o reálných koncentracích toxických látek jsou z hlediska možné expozice člověka nezbytné a zásadní. Naše výsledky úspěšně potvrdily praktické využití nově vyvinuté metody. Ve vzorcích vod jsme naměřili vyšší koncentrace microcystinů než s použitím předchozí metody neumožňující stanovení všech microcystinů a jejich fragmentů. Tato metoda výrazně zpřesňuje odhady zdravotních rizik spojených s možnou expozicí člověka cyanotoxiny.

Pracoviště RECETOX mi nabídlo nadstandardní zázemí pro provedení experimentů a také možnost své dosažené výsledky diskutovat. Díky projektu jsem mohl zakoupit reagentie a materiál pro provedení experimentů. Zakoupením elektronické pipety se zjednodušila i zpřesnila kvalita práce. Díky tomu jsem se mohl věnovat v ČR i ve světě málo prostudovanému problému, který kombinuje přístupy chemie životního prostředí, imunochemie a toxikologie.

Charakteristika dosažených výsledků z hlediska projektu

Stručně popište dosažené výsledky z hlediska cílů projektu a použitého způsobu řešení.

Cílů projektu bylo dosaženo systematickou prací na pěti úzce souvisejících, ale experimentálně nezávislých výzkumných blocích:

- (1)** Byla prostudována literatura související s výskytem a formami nejběžnějších toxinů sinic a nastudován princip jejich toxicity a stanovení. V rámci příprav byla shromážděna literatura umožňující naplánování optimalizačních kroků k úspěšnému sestavení nové metody stanovení microcystinů.
- (2)** Časově i manuálně byla nejnáročnější samotná část projektu související se samotnou optimalizací jednotlivých dílčích reagentů a postupů. V sérii na sobě navazujících kroků byly odzkoušeny různé koncentrace obou protilátek které mají zásadní vliv na úspěšné zvládnutí celé metody. Neméně významným krokem bylo

samostatné zvládnutí výroby enzymově značeného konjugátu, který je nezbytný pro stanovení spektrofotometrickou koncovkou. Kromě optimalizace reagií jsme se zabývali křížovou reaktivitou jednotlivých forem microcystinů vůči naší protilátce a hodnocení získaných dat s literaturou. Výsledky získané z této studie jsou součástí přílohy I.

- (3) Pro získání dat o křížové reaktivitě jsme separovali vybrané microcystiny pomocí metody HPLC-DAD z biomasy sinic z nádrže Nové Mlýny. Nami vybrané microcystiny jsou ty, které patří do skupiny nejčastěji nalézáných sinicových látek ve vodách ČR. Jedná se o kongenery microcystin-LR, -RR, -YR.
- (4) V rámci následných experimentů byli vytvořena kolekce experimentálních vzorků s různými obsahy nami separovaných microcystinů –LR,-RR,-YR. Koncentrace jednotlivých kongenerů byly v rozsahu 0-0,5 µg/L tak aby společně nepřesáhly rozmezí kalibrace 0,125-2 µg/l MCs. Tento experiment nám pomohl validovat optimalizovanou metodu a ověřit správnost měření při zachování environmentálně relevantních koncentrací. Každé dílčí měření během optimalizace i validace byly vždy realizovány v duplikátu pro potvrzení správnosti měření.
- (5) Nově vyvinutá imunochemická metoda byla použita pro měření přírodních vzorků vod z několika nádrží v ČR ze sezóny 2007. Získaná data z měření nám výrazně upřesní odhad zdravotního rizika souvisejícího s kontaminací vod sinicovými toxiny – microcystiny. Metoda najde svoje uplatnění také ve všech ekotoxikologických studiích kde je potřeba znát přesné koncentrace těchto látek. Samozřejmým cílem projektu je prezentace získaných výsledků na mezinárodní konferenci a příprava manuskriptu článku do odborného zahraničního časopisu.

Dalšími přínosy jsou:

- 1) Metodický a profesní rozvoj řešitele (studenta DSP) a univerzitního pracoviště (zavedení a optimalizace nové metody).
- 2) Motivace pre-graduální studentky pro samostatnou vědeckou práci (Eliška Sychrová - ve školním roce 2007-8 studentka 3. ročníku Obecné biologie, specializace Ekotoxikologie, která se aktivně podílela na realizaci dílčích experimentálních úkolů).

Účast na odborných akcích v porovnání s plánem

Uveďte

1. název akce, místo konání, dobu konání,
2. aktivní účast – přednáška, poster, apod.
3. plánovaná akce ano ne („ne“ zdůvodněte)

Účast na odborných akcích:

Society for Environmental Toxicology and Chemistry – SETAC Europe – Annual Meeting. Varšava, Polsko, 25-29.5.2008

Aktivní účast – poster – vybráno pro veřejnou prezentaci formou „poster Conner“

Tato akce nahradila účast na konferenci Environmental Toxicology 2008 (Španělsko)

Finanční náklady za účast hrazena z jiných zdrojů

Abstrakt – příloha II.

Z prostředků grantu byly uhrazeny náklady na další konferenci:

ROYAL SOCIETY WORKSHOP IN ACCRA GHANA- . *Analysis of microcystins in different matrices ; Microcystin kinetics (bioaccumulation, elimination) and biochemical responses in common carp and silver carp exposed to toxic cyanobacterial blooms.*

28.7. – 1.8. 2008, Accra, Ghana

Přednáška na konferenci

Abstrakt – příloha II.

Čerpání finančních prostředků (uvádět v tisících Kč na jedno desetinné místo)

	položka	Přiděleno	čerpání
1	Odměna řešitele	5	5
2	Odměna garanta	6	6
3	Odměny pro spolupracovníky	0	0
4	Zákonné odvody	4	4
5	Sociální fond	0,2	0,2
6	Dohody o provedení práce	20	20
7	Stipendium pro spolupracovníky	6	6
8	Cestovné	24	24,3
9	Studijní literatura	0	0
10	Drobný hmotný a nehmotný majetek	18	24,4
11	Materiál	29	22,3
12	Služby	0	0
13	Celkem	112,2	112,2

Zdůvodnění rozdílů v plánovaném čerpání finančních prostředků

Slovní komentář k jednotlivým položkám předchozí tabulky.

Drobné přesuny mezi částkami byly vždy prováděny až po dohodě s Mgr. Martinou Hlavatou z Rektorátu MU. Všechny přesuny byly schváleny a jsou doložitelné potvrzujícími e-maily. Cestovné i drobný hmotný majetek byl navýšen z důvodů zvýšení cen zejména z důvodů pohybu kurzu CZK/Euro. Zvýšení cen nebylo známo v době sestavení rozpočtu. Peníze se naopak ušetřili v kategorii materiál.

Datum: 30.5.2008