



Självständigt examensarbete, 15 hp,
Kandidatexamen i Biomedicinsk laboratorievetenskap
Vårterminen 2018

**Toxikologisk tillväxtstudie av
sötvattenalgen *Raphidocelis subcapitata*:
En jämförelse mellan flödescytometer
NovoCyte och automatisk cellräknare
TC20.**

Eva Andersson

Populärvetenskaplig sammanfattning

Val av den bästa metoden för cellräkningar i studien om kemikaliernas påverkan på encelliga gröna sötvattenalger.

Biologiska toxicitetstester utförs genom att utsätta en testorganism för olika koncentrationer av kemikalier eller avloppsvatten under en bestämd period. Det finns akuta toxicitetstester och kroniska. Resultat från akuta studier presenteras som EC50 värde, dvs. en effekt som hälften av testorganismerna uppnår efter en dos av kemikalien.

Tester som används som underlag för riskbedömningar ska utföras på kvalitetsmässigt acceptabelt sätt vilket innebär att laboratoriet måste följa ett kvalitetssystem som grundas på International Organization for Standardization (ISO) och Good Laboratory Practice (GLP). Den internationella standarden ISO 8692, som användes vid denna studie, är utformat för bestämning av tillväxthämningen hos encelliga grönalger då de utsatts för kemiska ämnen som finns i vatten.

Bestämning av antalet celler i provet kan göras med olika instrument som exempelvis, hemocytometer, spektrofotometer, flödescytometer eller automatiserad cellräknare. Skillnad mellan dem är metoden för cellräkningen, som kan göras genom att till exempel mäta absorberat eller emitterat ljus, mätning av celldiameter eller/och cellens inre delar.

Syftet med studien var att studera toxisk inverkan av en kemikalie (kaliumdikromat) på encellig sötvattenalg, *Raphidocelis subcapitata*, genom att räkna cellantal med två olika instrument, flödescytometer och automatisk cellräknare. Vidare att jämföra studiens EC50 medelvärde mot andra laboratoriernas EC50 värde i precisions syfte och att utvärdera de båda räknemetoderna gällande precision och analysid. Studiens huvudfrågeställningar var: Vilken av de valda cellräkningsmetoderna har bättre precision och analysid? Kan flödescytometrisk metod användas i framtida studier för toxikologiska tester med alger?

Cellräkningen gjordes med flödescytometer av märket NovoCyte och med automatiserad cellräknare TC20.

Tillverkning av testlösningar, testvalidering och kvalitetssäkring av testmetoder följde standarden ISO 8692 riktlinjer. Prov med alger förvarades i vitt ljus och 23°C temperatur i 72

timmar. Av beräknade EC50 värdena för de respektive metoderna gjordes ett statistisk test för att avgöra om EC50 medelvärde från två cellräkningsmetoder var identisk eller om det fanns större skillnader mellan dem. Testets precision kontrollerades med hjälp av resultat på EC50 värde angiven i standarden.

Analystid var 0,33 s/prov i flödescytometern och ca 60 s/prov i automatiserad cellräknare. EC50 medelvärde beräknades till 1,54 mg/L från räkning i flödescytometern och till 1,63 mg/L från räkning i cellräknaren. Den akuta toxicitetsanalysens precision kunde bekräftas som giltig eftersom båda mätmetodernas EC50 värden, vid jämförelse med ISO 8692 värde, befanns inom det tillåtna intervallet. Vid jämförelse av studiens två mätmetoder, observerades större spridning kring medelvärdet i cellräknarens resultat, där tre EC50 värden hamnade utanför det tillåtna intervallet. Däremot visade resultatet från flödescytometern mindre spridning och högre noggrannhet.

Cellräkning med flödescytometer ger mindre avvikelser, lägre variation, bättre precision och noggrannhet, samt kortare analystid än räkning med automatiserad cellräknare. Studien visar att flödescytometer skulle kunna användas i framtida toxikologiska tester med alger, men det krävs flera upprepade försök för att bekräfta fördelarna med analys i flödescytometern.

Författare/Author

Eva Andersson

Svensk titel/Title

Toxikologisk tillväxtstudie av sötvattenalgen *Raphidocelis subcapitata*:

En jämförelse mellan flödescytometer NovoCyte och automatisk cellräknare TC20.

Engelsk titel

Study of toxic growth inhibition with unicellular fresh water green algae *Raphidocelis subcapitata*:

Comparison between flow cytometer NovoCyte and automatic cell counter TC20.

Handledare/Supervisor

Helena Tassidis, Dr. Medicinsk vetenskap, Leg. BMA

Britt-Marie Svensson, Fil. Dr. Lektor i Miljövetenskap

Examinator/Examiner

Bodil Hernroth, Prof. Biomedicinsk laboratorievetenskap, Leg. BMA

Sammanfattning

Biologiska toxicitetstester utförs genom att exponera en testorganism för olika koncentrationer av kemikalier under en bestämd period. Det finns akuta toxicitetstester och kroniska. Resultat från akuta studier presenteras som EC50-värde (Effect Concentration, affecting 50 % of the population). Tester som används som underlag för riskbedömningar ska utföras på kvalitetsmässigt acceptabelt sätt som grundas på International Organization for Standardization (ISO) och Good Laboratory Practice (GLP). Syftet med studien var att studera toxisk inverkan av kaliumdikromat på encellig sötvattenalg, *R. subcapitata*, genom att räkna cellantal med två olika instrument: flödescytometer och automatisk cellräknare. Vidare att jämföra testernas EC50 medelvärde mot ISO 8692 angivet värde i precisions syfte och att utvärdera de båda räknemetoderna gällande precision och analysid. Kaliumdikromat användes för tillväxthibering vid toxicitetstest. EC50-resultaten visade ingen statistiskt signifikant skillnad mellan de båda instrumenten ($p=0,47$). Den akuta toxicitetsanalysens precision kunde bekräftas som giltig då båda mätmetodernas EC50 medelvärden vid jämförelse med ISO 8692 värde befanns inom bestämda 95% konfidensintervallet. Vid jämförelse av studiens två mätningmetoder, observerades större spridning kring medelvärdet i cellräknarens resultat, där tre EC50 värden hamnade utanför 95% CI. Däremot visade resultatet från flödescytometern mindre spridning och högre noggrannhet jämfört med cellräknarens. Studien visade att flödescytometer skulle kunna användas i framtida toxikologiska tester med encelliga alger, men det krävs flera upprepade försök för att bekräfta fördelar med analysen i flödescytometern.

Ämnesord: Toxicitetstest, *subcapitata*, EC50, ISO 8692, kaliumdikromat, flödescytometer, cellräknare, tillväxthibering

Abstract

Biological toxicity tests are performed by exposing a test organism to different concentrations of chemicals over a certain period of time. Results from acute studies are presented as EC50 (Effect Concentration, affecting 50% of the population). Tests used as a basis for risk assessments shall be performed in a quality acceptable way based on the International Organization for Standardization (ISO) and Good Laboratory Practice (GLP). The aim of this study was to study the toxic effect of potassium dichromate on unicellular green algae *R. subcapitata*, by counting cells with two different apparatus: flow cytometer and automatic cell counter. Additionally, to compare the EC50 mean values against the ISO 8692 value for control of test precision and to compare accuracy and analytical time of two methods. Potassium dichromate was used for growth inhibition in toxicity tests. The EC50 results showed no statistically significant difference between the two instruments ($p = 0.47$). The accuracy of acute toxicity analysis was confirmed as valid as both EC50 average measurement values compared to ISO 8692 value were found within the 95% confidence interval. When comparing the two methods of the study, greater spread was observed around the mean value in the cell count's results, where three EC50 values were outside 95% CI. The result of the flow cytometer had less spread and higher accuracy compared to the cell count. The study showed that flow cytometers could be used in future toxicological tests with algae, but several repeated tests are required to confirm the benefits of analysis with the flow cytometer.

Keywords

Toxicity test, *subcapitata*, EC50, ISO 8692, potassium dichromate, flow cytometry, cell counter, growth inhibition

Innehåll

| | |
|---|----|
| 1. Inledning | 8 |
| 1.1. Syfte | 9 |
| 1.2. Frågeställning..... | 10 |
| 1.3. Bakgrund | 10 |
| 1.3.1 Toxicitetsbestämning | 10 |
| 1.3.2 Densitetsbestämning med automatiserat cellräknare | 10 |
| 1.3.3 Densitetsbestämning med flödescytometer | 11 |
| 1.3.4 Kvalitetssäkring av testmetoder..... | 13 |
| 2. Material och metod | 13 |
| 2.1 Testorganismer och testlösningar | 13 |
| 2.2 Mätningmetoder | 15 |
| 2.2.1 Mikroskopisk observation och kontrollräkning | 15 |
| 2.2.2 Cellräkning efter 72 timmar..... | 15 |
| 2.2.3 Cellräkning med automatiserad partikelräknare | 16 |
| 2.2.4 Cellräkning i flödescytometer..... | 16 |
| 2.3 Bruskontroll..... | 16 |
| 2.4 Beräkningar | 16 |
| 2.5 Statistisk dataanalys..... | 17 |
| 2.6 Validering av testets precision..... | 17 |
| 3. Resultat | 17 |
| 3.1 Mikroskopisk observation och kvalitetssäkring av testmetoder..... | 17 |
| 3.2 EC50 resultat | 19 |
| 3.3 Statistisk test..... | 20 |
| 4. Diskussion | 21 |
| 4.1 Slutsats | 25 |

| | |
|------------------|----|
| Tackord..... | 25 |
| Referenser | 26 |
| Bilagor | 29 |

1. Inledning

Alger är primära producenter som kemiska byggstenar i hela akvatiska ekosystem. De stabiliserar många substrat i akvatiska livsmiljöer och kan också bli en viktig livsmiljö och föda åt många andra organismer (Stevenson, Bothwell & Lowe 1996).

Läkemedelsmetaboliter är ett ökande toxikologiskt miljöhot. Sjukhusavlopp och avlopp från klinisk fysiologiska laboratorier utgör de största utsläpp av läkemedelssubstanser och metaboliter (Lidman 2008). Vissa föroreningar kan vara mycket toxiska för vissa levande organismer. En del av dem kan orsaka akut toxicitet de andra - kronisk toxicitet. Exempelvis kan därför en stark oxiderande kemikalier såsom kaliumpermanganat (KMnO_4) eller kaliumdikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$) användas vid toxicitetstester och syreförbrukningsanalyser då de oxiderar det organiska materialet (IugazaEdu 2018).

Biologiska toxicitetstester utförs genom att exponera testorganismen för olika koncentrationer av vissa kemikalier eller avloppsvatten då exponentiellt växande testorganismer exponeras för testämnet under en viss period. Toxicitetsstudierna kan vara kroniska eller akuta. Resultat från akuta studier presenteras som EC50 - värde (Effect Concentration, affecting 50 % of the population). Ju lägre EC50 värdet är desto mer toxiskt är provet (Stevenson, Bothwell & Lowe 1996). Om det finns resultat från kroniska studier prioriteras dessa. Kroniska studier presenteras som No Effect Concentration (NOEC), No Effect Concentration Level (NOEL) -värde. Värdet som presenteras härstammar från den studie där lägst toxicitet påvisats. Sådana studier bör uppfylla kriterierna för god vetenskaplig praxis, följa riktlinjer framtagna av internationella organisationer och utförlig dokumentation av försöket skall finnas till hands (Blaise & Ferard 2007).

Tester som används som underlag för riskbedömningar ska utföras på kvalitetsmässigt acceptabelt sätt vilket innebär att laboratoriet måste följa ett kvalitetssystem som grundas på International Organization for Standardization (ISO) eller Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) riktlinjer för Good Laboratory Practice (GLP) (Naturvårdsverket 2011).

För optimala känslighet på toxiska effekter bör testalger finnas under obegränsad exponentiell tillväxt med rätt mängd av näringsämnen och kontinuerligt ljus under testperiod. Tillväxt och tillväxthämning kvantifieras från mätningar av algdensitet som

en funktion av tiden (OECD 2011). Densitetsbestämningen kan göras exempelvis med hemocytometer, spektrofotometer, flödescytometer och automatiserad cellräknare. Skillnad mellan dem är metod för cellräkningen (Blaise & Ferard 2007). Cellräkningen kan göras genom att mäta absorberat eller emitterat ljus, mätning av celldiameter eller / och granulartet genom att uppskatta storleken på den odlade populationen, uttryckt som det totala antalet celler eller kolonier i odlingen som helhet, eller som population per volym av kulturvolymen. Dvs. uppskattningar av populationens storlek, som våt eller torr vikt av biomassa, klorofyllhalt, innehåll av organiskt kväve, fosfor eller järn. Det andra sättet att räkna celler är uppskattningen av tillväxthastigheten, som kan uttryckas som graden av celldelning (Lin 2005).

Flödescytometern kan avläsa cellens inre struktur, vakuoler, halt av fotosyntetiska pigment, fluorescerande proteinuttryck samt celldiameter (Metezeau 1993). Spektrofotometer eller kolorimeter kan också användas vid densitetsbestämning. En omvandlingsfaktor som tillåter att räkna celler i torrsvikt är användbar vid densitetsbestämningar (OECD 2011). Kvantifiering av fytoplankton kan vara tidskrävande, då cellerna räknas i mikroskop eller andra cellräkningsinstrument. Att bestämma algdensitet med hjälp av kalibreringskurva för *Pseudokirchneriella subcapitata* är pålitligt och enkelt då det finns redan färdig regressionsmodell för att uppskatta celldensitet (Rodrigues, Arenzon, Raya-Rodriguez & Fontoura 2011).

Att räkna alger i flödescytometern är inte så vanligt, den används mest i kliniskt sammanhang men för att se om det kunde vara lönsamt att använda flödescytometern för andra ändamål som algräkning vid toxicitets tester, valdes detta instrumentet för denna studie.

1.1. Syfte

Syftet med studien var att studera toxisk inverkan av kaliumdikromat på encellig sötvattenalg, *Raphidocelis subcapitata*, genom att räkna cellantal med två olika instrument, flödescytometer och automatisk cellräknare. Att jämföra testernas EC50 medelvärde mot ISO 8692 interlaboratoriernas EC50 värde i metodvaliderings och precisions syfte. Att utvärdera båda räknemetoderna gällande precision och analystid.

1.2. Frågeställning

Vilken av de valda cellräkningsmetoderna har bättre precision och analys tid? Kan flödescytometrisk metod användas i framtida studier för toxikologiska tester?

1.3. Bakgrund

1.3.1 Toxicitetsbestämning

Den internationella standarden ISO 8692 är utformad för bestämning av tillväxthämningen hos encelliga gröna alger då de utsätts för kemiska ämnen som finns i vatten eller avloppsvatten. Denna metod är tillämpbar för ämnen som är lösliga i vatten (SIS 2012).

Vid toxicitetsbestämning av sötvattensalger enligt ISO 8692 mäts tillväxthämning hos planktonisk grön alg *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Chlorophyceae*), tidigare benämnd som *Raphidocelis subcapitata* och *Selenastrum capricornutum*, som är mest använda algerterna för toxicitetstester (Rodrigues, Arenzon, Raya-Rodriguez & Fontoura 2011).

1.3.2 Densitetsbestämning med automatiserat cellräknare

TC20-automatiserade cellräknaren använder mikroskopi med autofokus som analyserar flera plan för att identifiera det bästa planet. Att använda autofokus istället för subjektiv manuell fokusering är bättre vid bedömning av cellens viabilitet, eftersom ett felaktigt valt fokuseringsplan kan leda till felaktiga resultat. Den kan räkna celler i diameter mellan 6-50 μm , inom koncentrationsområde från 5×10^4 till 1×10^7 celler / ml (Bio-Rad 2018).

Cellräknaren använder engångsplattor för räkning som säkerställer jämn fördelning av celler genom hela räknekammaren, oavsett noggrannhet i pipetteringen. I komplexa prover som består av flera cellpopulationer, kan cellstorleken justeras genom att avgränsa mätområdet (*gate*)

(Figur 1) för att definiera populationen av intresse som kommer att räknas (Bio-Rad 2018).



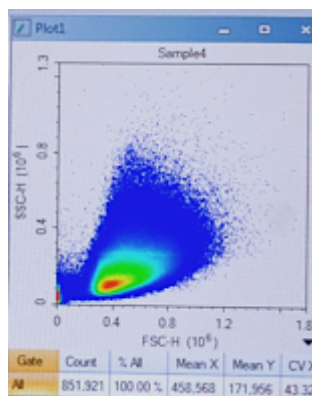
Figur 1. Gated count. TC20 cellräknaren kan räkna celler per en bestämd celldiameter. (Bild: Andersson 2018)

1.3.3 Densitetsbestämning med flödescytometer

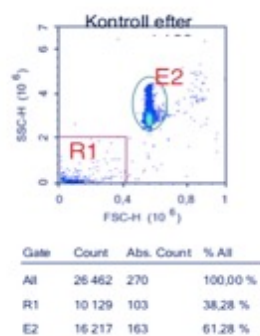
Flödescytometern kan på mycket kort tid kvantifiera cellegenskaper. ACEA NovoExpress™ flödescytometern kan användas för kvalitativ och kvantitativ mätning av celler och andra partiklar genom att detektera både biologiska och fysikaliska egenskaper. Den kan detektera framåtspritt ljus, sidospritt ljus och excitering av flera fluorescerande molekyler samtidigt. Lasern vid våglängd på 405 nm, 488 nm och 640 nm utför flerparameteranalys av cellerna eller partiklarna. Flödescytometern kan detektera en partikel med en storlek från 0,2 µm upp till 50 µm. Förutom mänskliga celler kan den också användas för att analysera djurceller, växtceller, encelliga plankton och bakterier. Den minimala provvolymen som krävs är 50 µL. Analystid vid Standard Mode är 66 µL / min, vid High-Throughput kan analyseras 120 µL / min (ACEA Biosciences 2015). En flödescytometer består av tre huvudsystem: vätska, optik och elektronik. Vätskesystemet transporterar partiklar i en ström till laserstrålen för avläsning med en hastighet $\geq 20\,000$ events / sekund. Absolute Count Precision har $CV < 5\%$ (ACEA Biosciences 2015).

När partiklar passerar genom laseravskiljningen sprider de laserljuset. Det utspridda och fluorescerande ljuset uppsamlas av lämpligt placerade linser. En kombination av stråldelare och filter styr det spridda och fluorescerande ljuset till lämpliga detektorer. Detektorerna producerar elektroniska signaler som är proportionella mot de optiska

signalerna (Quirke 1992). Listlägesdata samlas in på varje partikel eller händelse och är baserad på partiklarnas ljusspridnings- och fluorescerande egenskaper. Uppgifterna samlas in och lagras i datorn. Dessa data kan analyseras för att ge information om subpopulationer inom provet (Figur 2).



Figur 2. Celldensitets diagram. Spridna och emitterade ljussignaler är omvandlade till elektroniska pulser. (Bild: Andersson 2018)



Figur 3. Avgränsningar (Gate). R1 visar 38% av population, E2 visar 61% av population som kan tas till vidare analys (Bild: Andersson 2018).

En högre flödes hastighet används generellt för kvalitativa mätningar som immunofenotypning. Däremot en lägre flödes hastighet minskar förekomst av dupletter då cellkärnorna avläses. Korrekt drift av fluidkomponenter är viktig för att partiklarna ska kunna avskiljas ordentligt i laserstrålen. Därför måste operatören alltid se till att fluidsystelet är fri från luftbubblor och skräp och är rätt trycksatt under analys. Faktorer som påverkar ljusspridning är cellens membran, kärnan och eventuellt granulärt material inuti cellen. Cellform och topografi avgör den totala ljusspridningen (Quirke 1992).

Ljuset som sprids framåt - Forward Scatter (FSC) är proportionellt mot cellyta eller storlek. FSC är lämplig för detektering av partiklar större än en given storlek oberoende av deras fluorescens och används därför ofta i immunofenotypning. Sidospridat ljus - Side Scatter (SSC) är proportionellt mot cellgranularitet (Quirke 1992).

En elektronisk tröskel kan användas för att begränsa antalet händelser. Till exempel kan tröskeln sättas på FSC för att eliminera händelser såsom skräp som är mindre än tröskelkanalnumret (Quirke 1992). Genom en numerisk eller grafisk gräns (gate) kan partiklarnas egenskaper definieras och tas till en vidare analys. Baserat på FSC eller

cellstorlek, kan en gate ställas in på FSC vs SSC- plot för att endast tillåta analys av cellerna i bestämd storlek som i (Figur 3).

Absoluta cellantal erhålls vanligtvis antingen genom att välja NovoExpress programvarans funktion för Absolut Count eller genom att tillsätta en intern mikrosfärberäkningsstandard e-Beads till flödescytometriska provet. NovoExpress programvarans funktion Abs. Count omvandlar Events/ μL till events/mL som motsvarar de önskade cellantal/mL (ACEA Biosciences 2015).

1.3.4 Kvalitetssäkring av testmetoder

För att testet ska vara giltigt bör celldensitet i kontrollkulturerna ha ökat exponentiellt med faktor 62 som minst, inom 72-timmars testperiod. pH ska inte överstiga 9,6 i testets kontroll efter 72-timmars testperiod. Test med kontrollkemikalier ska göras och EC50 medelvärde från båda cellräkningsmetoder ska jämföras med ISO 8692 angiven EC50 värde. Om kriterierna för giltighet kan inte uppfyllas, skall analysmetod eller/och testkultur ersättas med nya (SIS 2012).

2. Material och metod

2.1 Testorganismer och testlösningar

Pseudokirchneriella subcapitata valdes enligt ISO 8692 från (Culture Collection of Algae and Protoza, UK), men har kommit till Högskolan under namnet *Raphidocelis subcapitata* (CCAP278/4 Culturcollection, UK) och denna användes till toxicitetstest och benämns i rapporten som *Raphidocelis subcapitata*.

Tillväxtmedium gjordes enligt ISO 8692 som ses i Bilaga 1. Stamlösningar till tillväxtmedium, med undantag NaHCO_3 steriliserades i autoklav vid 120 ± 2 °C. NaHCO_3 filterades med 0,2 μm membranfiltrering. Tillväxtmedium framställdes genom upplösning av stamlösningar i destillerat vatten enligt Bilaga 2. Detta ställdes i kylskåp vid 4 °C för två dagar, därefter kontrollerades pH som borde vara $8,1 \pm 0,2$ innan start av toxicitetstest.

För att anpassa *R. subcapitata* till testförhållandena och säkerställa att algen befinner sig i exponentiell tillväxtfas, framställdes 3 dagar före testpreparation, en ympkultur i tillväxtmedium, med startkoncentration 10^5 celler / mL. Detta gjordes i sex replikat på

96-brunns platta och inkuberades vid 23 ± 1 °C under kontinuerlig vitt ljus med styrka 10000 Lx. Ökningen av biomassa i ympkulturen (celldensitet) kontrollerades genom att räkna celler i flödescytometern varje dag under tre dagars testperiod. Biomassan syresattes för att behålla rätt pH genom att pipettera 10 gånger upp och ner.

En kemisk lösning av kaliumdikromat, $K_2Cr_2O_7$ (Riedel-de Haen, Seelze, Germany), 100 mg/L i olika koncentrationer tillsattes för att hämma tillväxten. De olika koncentrationerna av kaliumdikromat, erhöles med en spädningsserie där ökningsfaktorn inte överstiger 3,2 dvs. 0,2; 0,6; 1,0; 1,8; 3,2; 5,6; 10 mg/L.

Alla testlösningar gjordes så att de skulle ha bestämd kaliumdikromat koncentration och initial biomassa av testalger 10^5 celler /mL i alla teströr och i 96-brunnsplattans brunnar. Negativ kontroll bestod kaliumdikromat spädd med tillväxtmedium till koncentration 5,6 mg/L. För positiv kontroll användes biomassa av testalger 10^5 i tillväxtmedium.

Akut toxicitetsanalys utfördes på 96-brunnsplattor (Cellstar, USA) med 300 µL testlösning / brunn för flödescytometrisk cellräkning och i 12x75 mm rör (Sarstedt, Tyskland) med 2,5 ml testlösning / rör för cellräkning i automatiserat cellräknaren (TC20 Automated Cell Counter, BioRad, USA).

Cellens morfologi och antal kontrollräknades i ett mikroskop med räknekammare (Bürker, Germany) i början och i slutet av testet. Testlösningar i 12x75 mm rör analyserades i automatiserat cellräknaren vid testets startpunkt, efter 24 h, 48 h och efter 72 h. Den logaritmerade celldensitet av positiv kontroll, plottades mot antal timmar och tillväxtfaktor beräknades. Testlösningar på 96-brunns platta analyserades endast vid start och efter 72 h i flödescytometern NovoCyte, FNC (ACEA Biosciences Inc, San Diego).

Både 96-brunns plattor och 12x75 mm rör inkuberades vid 23 ± 1 °C under kontinuerligt vitt ljus 10 000 Lx som kontrollerades med en ljusmätare (Clas Ohlson, SE). Inkuberings utrustning kan ses i Figur 4. pH i 12x75 mm rör mättes efter varje 72 timmars inkubation för att säkerställa att tillväxten ligger inom det normala intervallet och testlösningar i rör blandades om varje dag. Testlösningar på 96-brunns platta blandades däremot inte om under hela testperioden och pH kontroll på plattan gjordes inte heller.

Underhåll av alger, som behövs i en glaskolv med tillväxtmedium vid rumstemperatur, gjordes genom att tillsätta tillväxtmedium (3:1) 1 gång / vecka och röra om dem varje dag.



Figur 4. Inkubator med kontinuerlig vit ljus, ventilation och temperatur inställd på 23°C. (Bild: Andersson 2018).

2.2 Mätningmetoder

2.2.1 Mikroskopisk observation och kontrollräkning

Mikroskopisk observation utfördes var 24 timma för att verifiera ett normalt och friskt utseende av ympkulturen, att kontrollräkna celler och att iaktta eventuell onormal utseende av alger, som kan orsakas av exponering för testsubstansen vid slutet av exponeringent.

2.2.2 Cellräkning efter 72 timmar

Akut toxicitetstest startade efter 72 timmar, då gjordes cellräkning med automatiserad partikelräknare för prov i 12x75 mm rör. 96-brunns platta analyserades i flödescytometern. För varje cellräkningsmetod antecknades tid för analysid / prov.

Totalt analyserades 12 testuppsättningar, där sex av dem i 12x75 mm rör var för automatiserad cellräkning och sex andra uppsättningar på 96-brunns plattor var för flödescytometrisk cellräkning.

2.2.3 Cellräkning med automatiserad partikelräknare

Precis innan provtagningen från ett 12x75 mm rör, blandades prov ordentligt för hand eller vortexades för att få en homogen provlösning. 10 µL prov från 12x75 mm provrör tillsattes på cellräknarens (TC20, BioRad, USA) objektglas (Dual Chamber for cell Counter, BioRad, USA). Objektglaset sattes i cellräknaren och totala antalet celler avlästes.

2.2.4 Cellräkning i flödescytometer

96-brunns platta med prov, som hade inkuberats i 72 timmar, analyserades i flödescytometer, inställd på provvolym 100 µL, tröskelvärde (antalet händelser) på 50 000 och flödes hastighet till 35 µL/min. Efter en veckas optimerades analysmetoden genom att sänka provvolymen till 10 µL, tröskelvärde ställdes in på 7 000 och flödes hastighet på 35 µL/min för att minska analys tid och brusmängd vid resultatavläsning.

Vid bearbetning av analysresultat i flödescytometerens programvara (NovoExpress, ACEA Biosciences Inc, San Diego), avgränsades oönskad population från de önskade genom gatefunktion. Cellantal beräknades med hjälp av *Absolut Count* funktion. För att få analysresultat i cell/ml, gjordes några justeringar under *Absolut Count* inställningar där *Abs. Count Unit* ändrades till 0,001. Standardinställning är events/µL.

2.3 Bruskontroll

För att bestämma bakgrundsbrus i flödescytometerens dotplottdiagram, gjordes en kontroll med 123 Count eBeads (eBioscience, USA). 100 µL av eBeads, tillsattes till tre 12x75 mm rör med 300 µL av lösning (1:3) av: kaliumdikromat upplöst i destillerat vatten till koncentration 5,6 mg/L; endast destillerat vatten och endast tillväxtmedium. Mängden av eBeads räknades i den automatiska cellräknaren och sedan analyserades samma rör i flödescytometern. Innan kontrollanalys, rengjordes flödescytometern med ett enklare program i NovoExpress (*Rinse* och *Cleaning*) för att avslänga eventuella kvarvarande proteiner och föroreningar från vätskesystemet.

2.4 Beräkningar

För att beräkna *Effect Concentration, affecting 50 % of the population* (EC50), beräknades först specifika tillväxten (μ) enligt formel $\mu = (\ln n_L - \ln n_0) / (t_L - t_0)$, där n_0 –

celldensitet i början; n_L – celldensitet efter 72 timmar; t_0 – tid för testens början (dagar); t_L – tid för testens slut (dagar).

Sedan beräknades specifika tillväxtens inhibering i procent för varje prov ($I_{\mu i}$) med formel $I_{\mu i} = (\mu_c - \mu_i) / \mu_c \times 100$, där μ_i är specifik tillväxt /prov och μ_c är tillväxt i positiv kontroll.

Dessa ($I_{\mu i}$) värdena användes sedan till (EC50) beräkningar med programmet *GraphPad Prism* (GraphPad trial Software Inc, CA, USA).

2.5 Statistisk dataanalys

Statistisk analys utfördes med oparat T-Test i *GraphPad Prism* (trial), (GraphPad Software Inc, CA, USA), för att avgöra om EC50 medelvärde från två cellräkningsmetoder var identisk eller om det med 95% konfidensintervall (CI) fanns signifikanta skillnader mellan dem, och för att utvärdera båda metodernas precision och noggrannhet.

2.6 Validering av testets precision

Testets precision validerades med hjälp av resultat på EC50 värde från interna laboratorier, där kaliumdikromat ($K_2Cr_2O_7$) användes som referenskemikalie vid toxikologiska tester med *Pseudokirchneriella subcapitata* enligt ISO 8692, (Bilaga 3).

3. Resultat

3.1 Mikroskopisk observation och kvalitetssäkring av testmetoder

Vid mikroskopisk observation kunde inga förändringar i cellutseende observeras. pH kontroll resultaterade i en pH-ändring under 72 timmar från 8,1 till 8,7.

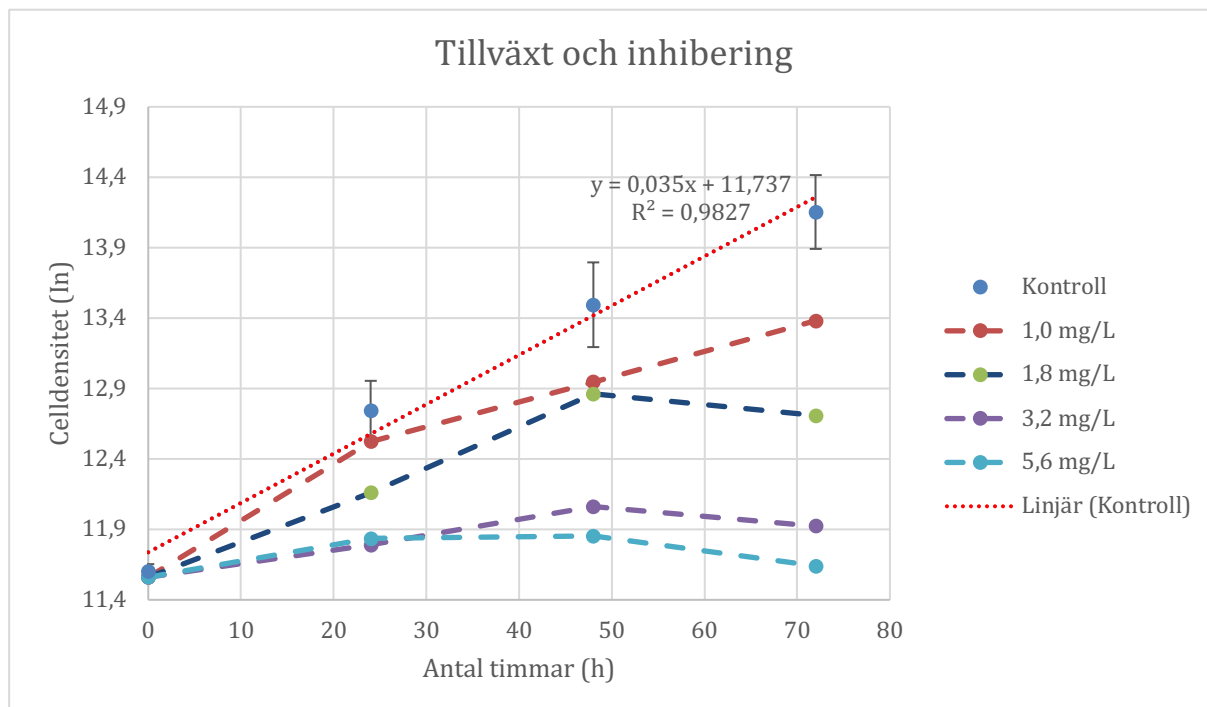
Analystid efter metodoptimering var ca. 60 s/prov i den automatiserade cellräknaren och 0,33 s/prov i flödescytometern.

Kontroll av den exponentiella tillväxtfasen i kontrollen, visade att celldensitet i alla toxicitetstesterna ökade med mer än faktor 67 ($\ln 67 = 4,2$). Siffran 4,2 innebär tillväxtökningen inom 72 timmars testperiod enligt ISO 8692 och (Tabell 1). Figur 5 visar

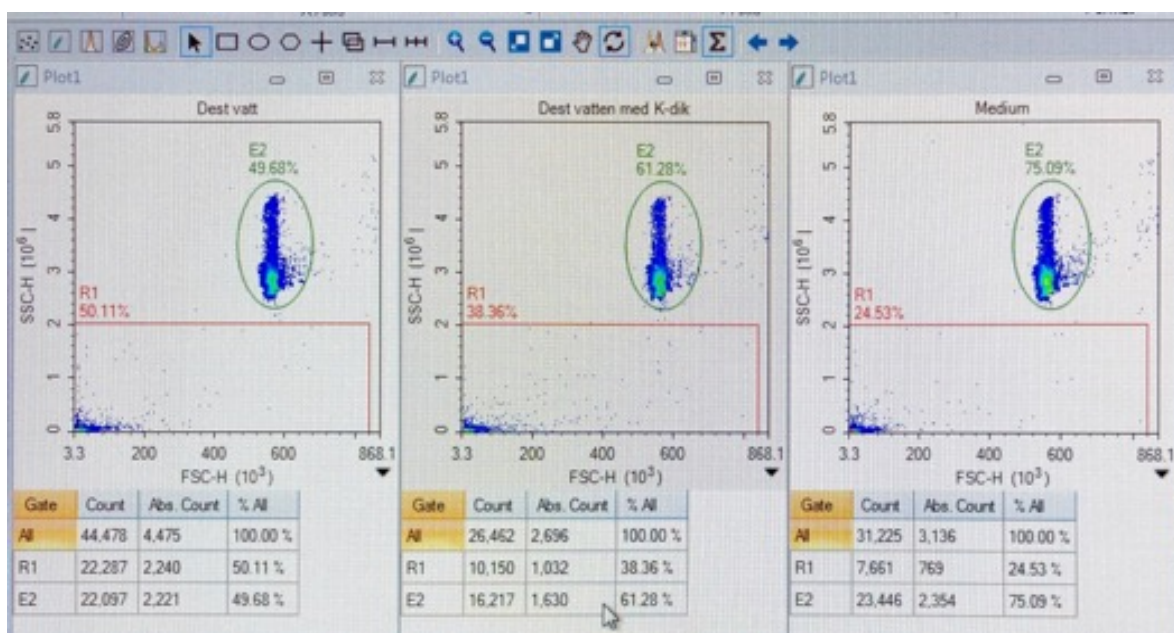
även resultat av tillväxthämning i kaliumdikromat med spädnings serie 1,0; 1,8; 3,2; 5,6 mg/L under 72 timmar testperiod.

Tabell 1. Celldensitet (antal/mL) och logaritmerat celldensitet ($^{10}\ln$) samt tillväxtökning (rödmarkerat) för *R. subcapitata* för positiv kontroll (n=6) i rör vid olika tidspunkter.

| Celldensitet (antal/ml) | Test 12/4 | Test 13/ | Test 15/4 | Test 16/4 | Test 17/4 | Test 20/4 |
|-------------------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Start | 110000 | 100000 | 117000 | 111000 | 110000 | 109000 |
| 24 h | 464000 | 374000 | 266000 | 301000 | 336000 | |
| 48h | 871000 | 638000 | 500000 | 665000 | 1090000 | |
| 72h | 965000 | 1450000 | 1420000 | 1630000 | 2040000 | 1150000 |
| Tillväxtökning | 8,8 | 14,5 | 12,1 | 14,7 | 18,5 | 10,6 |
| (ln) celldensitet | Test 12/4 | Test 13/ | Test 15/4 | Test 16/4 | Test 17/4 | Test 20/4 |
| Start | 11,6 | 11,5 | 11,7 | 11,6 | 11,6 | 11,6 |
| 24 h | 13,0 | 12,8 | 12,5 | 12,6 | 12,7 | |
| 48h | 13,7 | 13,4 | 13,1 | 13,4 | 13,9 | |
| 72h | 13,8 | 14,2 | 14,2 | 14,3 | 14,5 | 14,0 |



Figur 5. Punktdiagram med 98 % regression för tillväxten av *R. subcapitata* i kontrollrör under 72 timmar plottad mot $^{10}\log$ celldensitet. Data är presenterat som medelvärde (n=6) \pm SD. Tillväxthämning med kaliumdikromat i olika koncentrationer visas som olikfärgade linjer med log celldensitets medelvärde (n=2).



Figur 6. Flödescytometrisk analys av eBeads i destillerat vatten (bild till vänster), destillerat vatten och kaliumdikromat och i bilden till höger i tillväxtmedium. Gate med E2 är eBeads, R1-gate är brus. Absolut Count inställd på events/ μ L. (Bild: Andersson 2018)

Kontroll av brus med eBeads påvisade förekomst av brus i (gate R1) (Figur 6) vid flödescytometrisk analys. Brus detekterades i alla prover och testens kontroller.

Skillnad mellan cellräkning med automatiserad cellräknare och flödescytometer (FCA) visas i Tabell 2 nedan.

Tabell 2. Cellräknings resultat (cellantal/ml $\times 10^5$) med eBeads från cellräknaren och från flödescytometern.

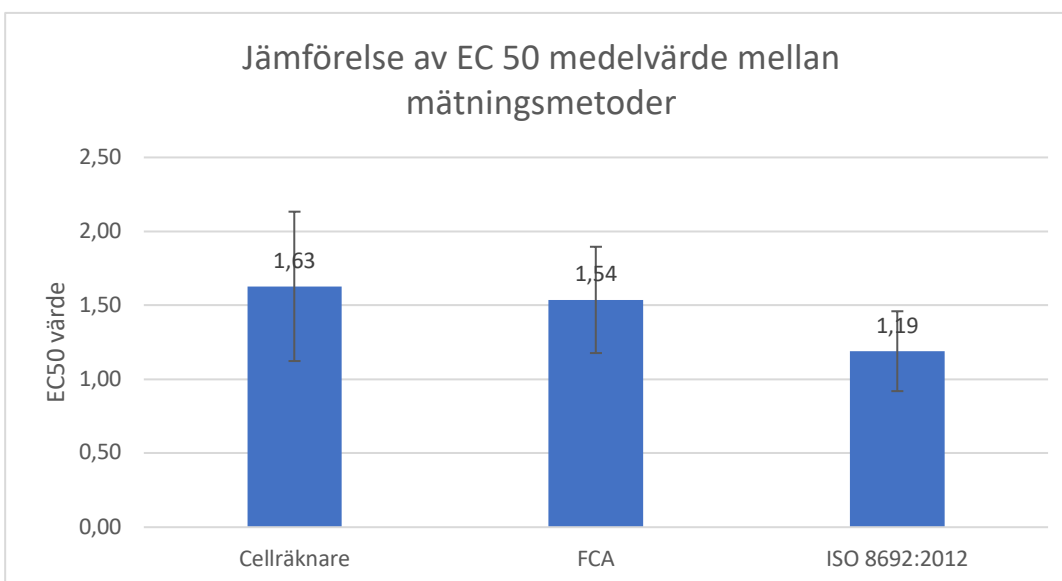
| | Cellräknare | Flödescytometer |
|---------------------------------|-------------|-----------------|
| Destillerat vatten | 3,12 | 2,22 |
| Dest. vatten med kaliumdikromat | 2,20 | 1,63 |
| Odlingsmedium | 2,96 | 2,35 |

3.2 EC50 resultat

Medel EC50 resultat av två genomförda cellräkningsmetoder och medel EC50 resultat från ISO 8692 kan ses i Tabell 2 och i Bilaga 3. Tabellen visar beräknad variationskoefficient (CV%) per mätningmetod och standardavvikelse (SD). Stapeldiagram av EC50 medelvärde med tillhörande SD visas i Figur 7.

Tabell 2. EC50 värde, SD och CV per mätningmetod.

| | Cellräknare | Flödescytometer | ISO 8692 |
|--------------------------|-------------|-----------------|----------|
| Medel EC50 (mg/L) | 1,63 | 1,54 | 1,19 |
| CV (%) | 31 | 23 | 23 |
| SD (mg/L) | 0,51 | 0,36 | 0,27 |



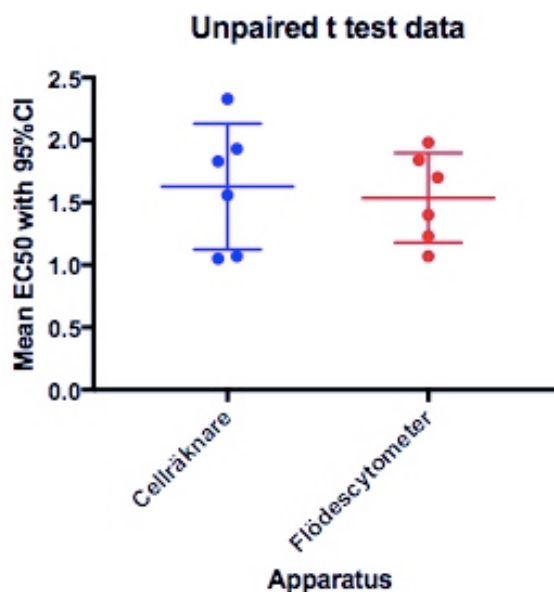
Figur 7. Jämförelse av EC50 medelvärde \pm SEM (mg/L) från automatiserad cellräknare (n=6), flödescytometer (FCA) (n=6) och resultat från interna laboratorier (ISO 8692) (n=9).

3.3 Statistisk test

De erhållna resultat på EC50 värde som beräknades i *GraphPad Prism (Trial)* användes till statistisk analys för att avgöra om EC50 medelvärde från två cellräkningsmetoder var identiska eller om det fanns signifikanta skillnader mellan dem. Analysresultat från operat T-Test *GraphPad Prism (Trial)* kan ses i Bilaga 4 och i Figur 8. Jämförelsen av varians mellan två mätserier i T-testets F-test gav F-värde 1,97 och p-värde 0,47. Detta innebär att det inte finns signifikanta skillnader vid jämförelsen av varians.

Noll Hypotes, som anger att metodernas medelvärde är identiska, kunde inte förkastas för att resultatet från den operade T-testen visade att medelvärdet inte ligger inom 95% CI (Bilaga 4).

I Figur 8 visas skillnaden mellan spridningen kring EC50-medelvärdet för de två analysmetoderna (95% konfidensintervall). Medel \pm standardmedelfel (SEM) i resultat från cellräknaren (n=6) var 1,63 mg/L \pm 0,21 och från flödescytometern (n=6) var 1,54 mg/L \pm 0,15 (GraphPad Prism, 2018).



Figur 8. Punkterna indikerar spridningen av EC50 värden för de två analysmetoder (95% konfidensintervall) (GraphPad Prism).

4. Diskussion

Akut toxicitetsanalys med *R. subcapitata* kunde bekräftas som giltig när båda mätningensmetoder EC50 medelvärden jämfördes med ISO 8692 EC50 värde. Att utföra testet på 96-brunns plattor istället för glaskolvar och flaskor, gav godkända resultat vad gäller testets validitet enligt ISO 8692:2004 (Nagai, Taya, Annoh & Ishihara 2013). Även Skjelbred Edvardsen och Andersen (2012) försökte optimera metoden genom att ha testkultur i förhållanden som efterliknar aklimatiserad tillväxttakt i mikroplattor (Skjelbred, Edvardsen & Andersen 2012).

Vid kontroll av exponentiell tillväxt, då celldensitet i alla kontrolltester borde öka med minst faktor 67 inom 72 timmars testperiod (enligt ISO 8692) registrerades i denna studie en genomsnittlig ökning av cellantal med 13,2 celler/mL. Den största ökningen

observerades när prover blandades om varje dag och då de exponerades för starkare ljusintensitet. Det skedde då solens ljus genom fönstret gav en extra ljuskälla till odlingen. Därför är det viktigt, att vid nästa försök ha inkubatorn med testalger i samma ljusförhållande och eventuellt ha en provomrörning för alla testuppsättningar. Vid fluorescensmätningar är det viktigt att testkultur är i en balanserad tillväxt där cellkompositionen förblir konstant, så att pigmentökningen (klorofyll a och b) i testkultur inte påverkar mättningsresultaten (Lin 2005).

Studien gav detekterbara EC50 värde i alla testade kaliumdikromatkoncentrationer. Även den lägsta koncentrationen 0,2 mg/L hade toxisk inverkan på *R. subcapitata*.

Om studien skulle upprepas med *R.* eller *P. subcapitata* vid toxicitets test, föreslås följande kaliumdikromat-koncentrationer 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L; 2,0 mg/L med minst tre replikat per koncentration samt positiv och negativ kontroll med respektive 3 replikat för att få detekterbara EC50 värden. Vidare är det vid akut toxicitetstestning ofta intressant att erhålla värde på den lägsta koncentration av kemikalien som ger respons på organismen (LOEC).

Testets precision blev godkänt vid validering med angivet ISO 8692 EC50 medelvärde (1,19 mg/L \pm 0,27), (n=9) för *P. subcapitata*, då kaliumdikromat användes som kontroll kemikalie. EC50 medelvärdet för båda mättningsmetoderna hamnade inom det bestämda 95% konfidensintervallet, därför kunde testets giltighet bekräftas för båda analysmetoder (Figur 9), (SIS 2012), (Simonsen 2005).

Eftersom toxicitetsstudien syftade till att jämföra medel EC50 värde från två mättningsmetoder, som inte var parade eller likartade innan cellräkningen (Quora 2018), valdes oparat T-test som mest lämplig i denna studien (GraphPad 2018). Vid jämförelse av studiens två mättningsmetoder, observerades större spridning kring medelvärdet för den automatiserade cellräknarens resultat (1,63 mg/L \pm 0,51), där tre mättningsresultat hamnade utanför 95% CI (Figur 10). Flödescytometerens EC50 värden hade däremot mindre spridning och högre noggrannhet (1,54 mg/L \pm 0,36) jämfört med cellräknarens. Analysresultat av EC50 från den automatiserade cellräknaren gav en variationskoefficient (CV) på 31%, medan flödescytometrisk analys gav CV 23%. Noll-hypotes, som angav att metodernas medelvärde var identiska visade dock att den sannolikheten bara var 85%. Vid jämförelsen av varians mellan två mätserier med F-test, kunde det konstateras att det

inte fanns signifikanta skillnader mellan medelvärdena. Vid test av outliers fanns heller inga EC50 värden som var avvikande och som borde ha tagits bort från analysresultaten.

Resultatet kunde bekräfta att det finns fördelar med den flödescytometriska analysen vid algtoxicitetstester, men studien måste upprepas flera gånger då 6 testförsök inte anses tillräckligt för metodvalidering. Upprepade analyser möjliggör kontroll av förändringar i precision vid en analytisk process (Nilsson, Stensiö & Lundgren 2016).

Kontroll av brus som gjordes med eBeads, påvisade brus i alla prover. Eftersom cellräknaren TC20 inte kan filtrera bort de förekommande brus lika bra som flödescytometern gör, ger den mer varierande resultat vid cellräkningen. Anledningen till varierande resultat kan vara smuts på objektglaset, prov som tas till analys är olik homogena (mänsklig faktor som påverkar provblandnings noggrannhet) och andra partiklar som räknas med, då användardefinierad cellsortering var inte gjordes eller den var feljusterad. Med cellräknaren TC20 kan olika populationer av intresse avgränsas för att få fram resultat med högre precision enligt Bio-Rad användarmanual, men den är sämre på att avgränsa celler av samma population. Det kan vara därför den visade sämre precision och noggrannhet jämfört med de flödescytometriska analysen.

Vid stora analysmängder är inte lönsamt att använda cellräknaren som cellräkningsmetod. För det första, cellräknarens engångs-objektglas kan upplevas ganska kostsamt (400 kr för 60 analyser) (Bio-Rad 2018) och för det andra, det tar lång tid (ca. 1 min/prov) om många analyser skall utföras. Här spelar även blandning av provet inför pipetteringen på objektglaset en stor roll för analysens resultat, eftersom prov med alger bör vara väl blandat (homogen) inför cellräkningen (Lin 2005). Det tar ca. 1 min/prov för provblandning och pipetteringen vid cellräkning i cellräknaren. Hela cellräkningsprocessen skulle ta mer än 3 timmar för 100 prov vid oavbrutet arbete av en person.

Vid flödescytometrisk analys analyseras däremot hela 96-platta med inställt program utan någon manuell hantering. Provblandning och provtagning från analysplattan görs av analysinstrument, vilket leder till högre precision och noggrannhet. Analys tar 0,33 s/prov och ca. 0,70 s/prov tar provblandning och systemsköljning i analysinstrument. Hela 96-bruns plattan kan vara klar för avläsning på mindre än 1,5 timme. Flödescytometern kan räkna fler celler och kan med hjälp av gatefunktion (Figur 3) avgränsa oönskade partiklar noggrannare och tydligare jämfört med cellräknaren som räknar osorterade celler per

bestämd celldiameter. Detta pga. att flödescytometern möjliggör multi – parameters analys som läser av cellstorlek, densitet, naturlig fluorescens från ex. alger på en och samma gång (Dennis, Landman, Wood & Hamilton 2011).

De automatiska räkneinstrument kan inte skilja mellan levande och döda celler däremot kan en flödescytometer detektera levande celler baserade på deras klorofyll *a* fluorescens. Toxicitetstester med flödescytometrisk cellräkning kan ha så låg initial celldensitet (100 celler / mL), som motsvarar den densitet som algen ofta har i naturliga vatten (Blaise & Ferard 2007). Även om den automatiska cellräknaren kan ge ett levande / död procent och antal, kan den inte räkna en viss typ av celler och utelämna ointressanta celler från en räkning. Detta är möjligt med flödescytometern (Biosciences 2014).

I en blandad population av celler eller om cellerna har förändrats under testperiod (såsom: levande/döda; apoptotiska eller nekrotiska) kan olika fluorokromer användas för att särskilja separata subpopulationer (Metzeau 1993). Färgmönstret av varje subpopulation, kombinerat med FSC och SSC data, kan användas för att identifiera vilka celler är närvarande i ett prov och att räkna deras relativa procentandelar. Cellerna kan också sorteras, om detta behövs (Quirke 1992).

Det finns två viktiga aspekter att tänka på vid inkubation av alger på 96-brunns plattor. Celldensitet måste vara så låg att testkulturerna få tillräckligt med koldioxid och syre, och ljusmängd måste vara samma i alla testbrunnar (celler inte ska överskugga varandra) under hela testperiod för att tillväxtkurvan skall kunna baseras på antagandet att hela testkulturen får samma testförhållande (Van Wagenen et al. 2014).

Det finns många fördelar med att utföra toxicitetstest på mikropeltor. För det första kan små volymer av testkultur (100 µL/brunn) användas, man sparar plats i inkubatorn och multipipettering kan utföras vilket leder till bättre precision och noggrannhet (Blaise & Ferard 2007). En annan aspekt som är viktig att tänka på vid toxicitetstester är att olika organismer är olika sensitiva för samma kemikalie. Detta kan bero på att olika arter har olika upptagningsförmåga, och även inom samma arter kan upptag av viss kemikalier variera beroende på det medium de växer i, temperatur och ljus (Afkari, Ababna & Fathi 2010).

Eftersom respons på en kemikalie kan skilja sig markant mellan olika arter, måste toxicitetstester göras enligt internationella standarder med en lämplig art för att analys resultat skulle räknas som giltig (Nagai, Taya, Annoh & Ishihara 2013).

4.1 Slutsats

Flödescytometrisk analys på 96-brunnsplattor gav mindre SD, lägre CV% bättre precision och noggrannhet samt kortare analystid än den automatiserade cellräknaren. Analysmetoden med automatiserad cellräkning som utfördes i 12x75 mm rör var sämre på alla dessa aspekter.

Studien visade att flödescytometer skulle kunna användas i framtida toxikologiska tester med alger, men det krävs flera upprepande försök för att bekräfta fördelar med analys i flödescytometern. Vid upprepande försök är det viktigt att inkubera med testalger under samma förhållanden. Dvs. testalger ska finnas i likadana rör eller plattor för båda cellräkningsmetoder, i samma ljusförhållande och eventuell provomrörningen för alla testuppsättningar.

Tackord

Jag vill rikta ett stort tack till mina handledare Helena Tassidis och Britt-Marie Svensson för all kunskap och hjälp ni bidragit med under projektets gång. Jag vill även tacka mina studiekamrater för att ni hade gjort min vardag lite roligare.

Referenser

- ACEA Biosciences (2015). *NovoCyte™ Flow Cytometer Operator's Guide*. San Diego, USA: ACEA Biosciences.
- ACEA Biosciences (2015). *NovoExpress Software Guide*. San Diego, USA: ACEA Biosciences. No. 1.2.1.
- Afkar, E., Ababna, H. & Fathi, A. A. (2010). Toxicological Response of the Green Alga *Chlorella vulgaris*, to Some Heavy Metals. *American Journal of Environmental Sciences*, 6(3), pp. 230–237, doi:10.3844/ajessp.2010.230.237
- Bio-Rad (2018). *TC20™ Automated Cell Counter*. Bio-Rad Laboratories. <https://www.bio-rad.com/en-se/product/tc20-automated-cell-counter?ID=M7FBG34VY> [2018-04-6].
- Blaise, C. & Ferard, J.-F. (2007). *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations Toxicity Test Methods*. Netherlands: Springer.
- Dennis, M. A., Landman, M., Wood, S. A. & Hamilton, D. (2011). Application of flow cytometry for examining phytoplankton succession in two eutrophic lakes. *Water Science & Technology*, 64(4), p. 999, doi:10.2166/wst.2011.099
- GraphPad (2018). *GraphPad Statistics Guide*. Graphpad. https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/how_the_unpaired_t_test_works2.htm?toc=0&printWindow [2018-04-10].
- IugazaEdu (2018). *4 Organic pollution*. Elnabris. http://site.iugaza.edu.ps/elnafris/files/2016/11/4-Organic-pollution_1_Oxygen-Demanding-wastes-20161.pdf [2018-04-5].
- Lidman, U. (2008). *Toxikologi- Läran om gifter*. 1st ed. Studentlitteratur.
- Lin, S. (2005). ALGAL CULTURING TECHNIQUES. *Journal of Phycology*, 41(4), pp. 906–908, doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00114.x
- Metezeau, P. (1993). *Flow cytometry in microbiology*. Research in Microbiology. Caister Academic Press.

- Nagai, T., Taya, K., Annoh, H. & Ishihara, S. (2013). Application of a fluorometric microplate algal toxicity assay for riverine periphytic algal species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, pp. 37–44, doi:10.1016/j.ecoenv.2013.04.020
- Naturvårdsverket (2011). *Naturvårdsverkets handbok 2010:5 om Vattenskyddsområde*. 1st ed. Stockholm: Elektronisk publikation.
- Nilsson, A., Stensiö, K.-E. & Lundgren, B. (2016). *Validering av kemiska analysmetoder*. Swedac.
- OECD (2011). OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. *Organisation for Economic Cooperation and Development*, (April), pp. 1–25, doi:10.1787/9789264203785-en
- Quirke, P. (1992). Introduction to Flow Cytometry. *Journal of Clinical Pathology*, 45(3), pp. 275–276, doi:10.1136/jcp.45.3.275-d
- Quora (2018). *What is the difference between a paired and unpaired t-test?* <https://www.quora.com/What-is-the-difference-between-a-paired-and-unpaired-t-test> [2018-04-10].
- Rodrigues, H. L. R., Arenzon, A., Raya-Rodriguez, M. T. & Fontoura, N. F. (2011). *Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*.
- Simonsen, F. (2005). *Analysteknik: instrument och metoder*. 1:2. Studentlitteratur AB. Lund.
- SIS (2012). *EN-ISO 8692:2012 Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae (ISO 8692:2012)*. Stockholm: Swedish Standards Institute (SIS).
- Skjelbred, B., Edvardsen, B. & Andersen, T. J. (2012). A high-throughput method for measuring growth and loss rates in microalgal cultures. *Applied Phycology*, 24(6), doi:https://doi.org/10.1007/s10811-012-9819-z
- Stevenson, R. J., Bothwell, M. L. & Lowe, R. L. (1996). *Algal Ecology. Freshwater Benthic Ecosystems*. London: Academic Press LTD.
- Van Wagenen, J., Holdt, S. L., De Francisci, D., Valverde-Pérez, B., Plósz, B. G. &

Angelidaki, I. (2014). Microplate-based method for high-throughput screening of microalgae growth potential. *Bioresource Technology*, 169, pp. 566–572, doi:10.1016/j.biortech.2014.06.096

Bilagor

Bilaga 1. Stamlösningar till tillväxtmedium

ISO 8692:2012(E)

Table 1 — Mass concentrations of nutrients in the test solution

| Stock solution | Nutrient | Mass concentration in stock solution | Final mass concentration in test solution |
|---|---|--------------------------------------|---|
| 1: Macronutrients | NH ₄ Cl | 1,5 g/l | 15 mg/l (N: 3,9 mg/l) |
| | MgCl ₂ ·6H ₂ O | 1,2 g/l | 12 mg/l (Mg: 2,9 mg/l) |
| | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 1,8 g/l | 18 mg/l (Ca: 4,9 mg/l) |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1,5 g/l | 15 mg/l (S: 1,95 mg/l) |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,16 g/l | 1,6 mg/l (P: 0,36 mg/l) |
| 2: Fe-EDTA | FeCl ₃ ·6H ₂ O | 64 mg/l | 64 µg/l (Fe: 13 µg/l) |
| | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 100 mg/l | 100 µg/l |
| 3: Trace elements | H ₃ BO ₃ ^a | 185 mg/l | 185 µg/l (B: 32 µg/l) |
| | MnCl ₂ ·4H ₂ O | 415 mg/l | 415 µg/l (Mn: 115 µg/l) |
| | ZnCl ₂ | 3 mg/l | 3 µg/l (Zn: 1,4 µg/l) |
| | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 1,5 mg/l | 1,5 µg/l (Co: 0,37 µg/l) |
| | CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0,01 mg/l | 0,01 µg/l (Cu: 3,7 ng/l) |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 7 mg/l | 7 µg/l (Mo: 2,8 µg/l) | |
| 4: NaHCO ₃ | NaHCO ₃ | 50 g/l | 50 mg/l (C: 7,14 mg/l) |

^a H₃BO₃ can be dissolved by the addition of 0,1 mol/l NaOH.

Bilaga 2. Tillverkning av tillväxtmedium

7.1 Preparation of growth medium

Prepare a growth medium by adding an appropriate volume of the nutrient stock solutions (5.3) to water (5.2).

Add to approximately 500 ml of water (5.2):

- 10 ml of stock solution 1 (5.3);
- 1 ml of stock solution 2 (5.3);
- 1 ml of stock solution 3 (5.3);
- 1 ml of stock solution 4 (5.3).

Make up to 1 000 ml with water.

Before use, equilibrate the medium by leaving overnight in contact with air, or by bubbling filtered air through it for 30 min. After equilibration, adjust the pH if necessary to $8,1 \pm 0,2$, using either 1 mol/l hydrochloric acid or 1 mol/l sodium hydroxide solution.

Bilaga 3. Referens EC50 för validering av testets precision

12 Precision

Interlaboratory tests based on the test specified in this International Standard were carried out in 1980 and 1981. The results obtained with the reference substances $K_2Cr_2O_7$ and 3,5-dichlorophenol are shown in Table 2. At the time of publication, review of the reference tests indicates that the sensitivity of the strains has not changed significantly.

Table 2 — Interlaboratory test results for E_rC_{50}

| Test organism and test substance | Number of laboratories | Outliers | Mean value mg/l | Standard deviation mg/l | Coefficient of variation C_v % |
|----------------------------------|------------------------|----------|-----------------|-------------------------|----------------------------------|
| <i>D. subspicatus</i> | | | | | |
| Potassium dichromate | 20 | 4 | 0,84 | 0,12 | 14 |
| 3,5-Dichlorophenol | 18 | 2 | 6,42 | 2,38 | 37 |
| <i>P. subcapitata</i> | | | | | |
| Potassium dichromate | 9 ^a | 4 | 1,19 | 0,27 | 23 |
| 3,5-Dichlorophenol | 9 ^a | 4 | 3,38 | 1,30 | 38 |

^a The high number of outliers in the tests with *P. subcapitata* is due to the use of different growth media (with different pH values). Results from tests using media whose pH deviates from the growth medium specified in this International Standard have been excluded.

To prove the validity of the test system, it is recommended to test at least one reference substance (e.g. when using a strain or after changing test conditions). Results should be compared to those given in Table 2.

NOTE The mean control growth rates determined in the interlaboratory test were $1,74 d^{-1}$ (coefficient of variation, $C_v = 27\%$) for *D. subspicatus* and $1,91 d^{-1}$ ($C_v = 23\%$) for *P. subcapitata*. These growth rates suggest an increase in cell density by at least 150.

Bilaga 4. Resultat av operat t-test med *GraphPad Prism*

| | | | |
|-------------------------------------|-------------------|----|---------------------------|
| Mean ± SEM of column A | 1,63 ± 0,206, n=6 | | |
| Mean ± SEM of column B | 1,54 ± 0,147, n=6 | | |
| Difference between means | -0,0917 ± 0,253 | | |
| 95% confidence interval | -0,655 to 0,472 | | |
| R squared (eta squared) | 0,013 | | |
| F test to compare variances | | | |
| F, DFn, Dfd | 1,97, 5, 5 | | |
| P value | 0,4732 | | |
| P value summary | ns | | |
| Significantly different (P < 0.05)? | No | | |
| Model comparison | SS | DF | Probability it is correct |
| Null H. Population means identic | 1,95 | 11 | 85,26% |
| Alternative H: Distinct population | 1,92 | 10 | 14,74% |
| Ratio of probabilities | | | 5,78 |
| Difference in AICc | | | -3,51 |