

RECE TOX RESEARCH CENTRE FOR ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND ECOTOXICOLOGY

Ekotoxikologické biotesty

„Toxicita & genotoxicita na prokaryotických mikroorganismech“

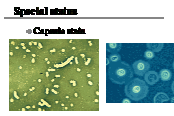


„Možná, že se vám pane doktore zdá, že tady nikdo není. Ale já ji tuším, tu bestii bakteriální!“
Kresba © Pavel Kantorek

2008 Přednášející: **RNDr. Pavel Čupr, Ph.D.**

Prokaryotes

- DNA is not in a membrane; is a circular chromosome.
- Lack other membrane-enclosed organelles.
- DNA is not associated with histone proteins.
- Cell walls contain peptidoglycan.

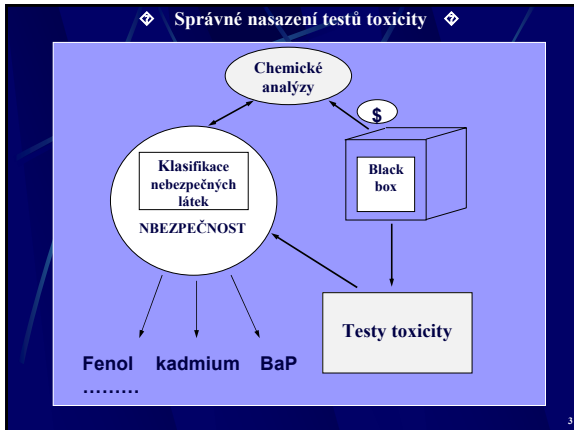


Shapes of Prokaryotes

- Cocci: round
 - diplococci ●●
 - streptococci ●●●●
 - tetrads-groups of 4 ●●●●
- Rods: coccobacilli —
- Spiral: vibrios, spirilla, spirochetes
- Star-shaped, square flat cells, triangular

Prokaryotes

- Size
 - 0.2 to 2.0 μm in diameter
 - 2 to 8 μm in length



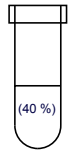
TEST TOXICITY: experimentální design

BIOTA (bakterie) + KONTAMINANT vzorek z ŽP

- Testy jsou prováděny v adekvátní ředící řadě!

- Biologický materiál jen ve stejné kvalitě,

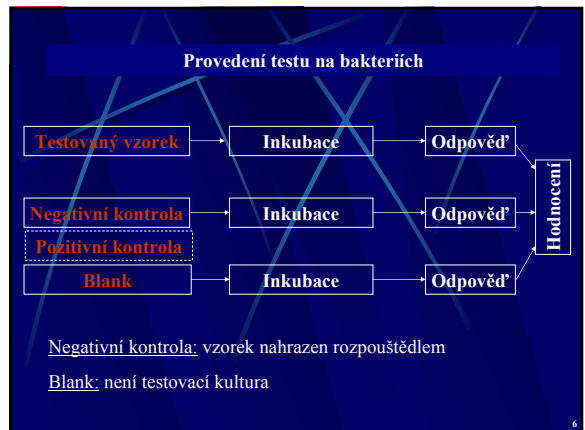
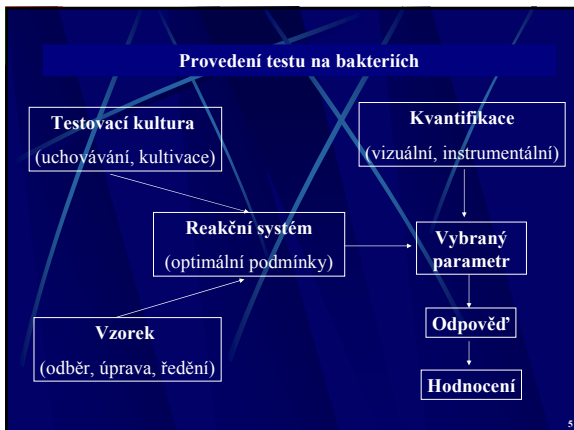
- Standardní podmínky testu.

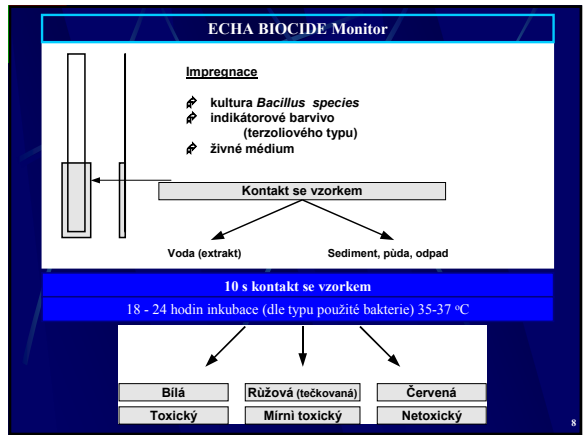
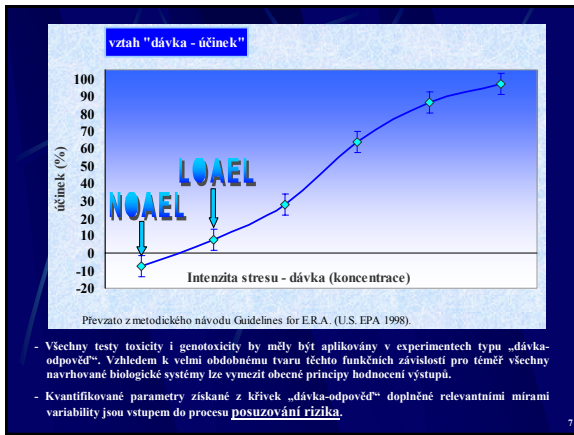


- co nejméně ředit vzorek (80 %) – “falešná nezávadnost”

? EFEKT ?
+ -

LOEC, NOEC, EC₅₀, IC₅₀...





ECHA BIOCIDE Monitor

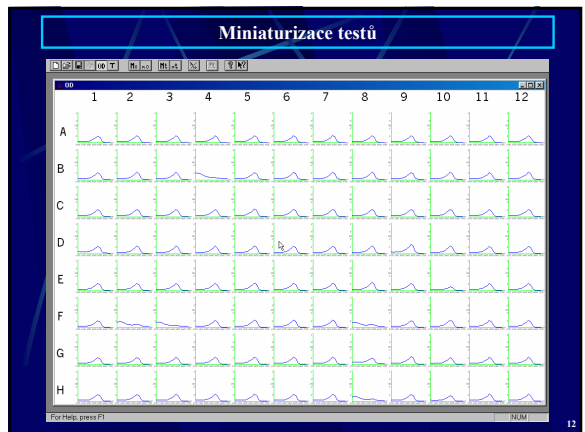
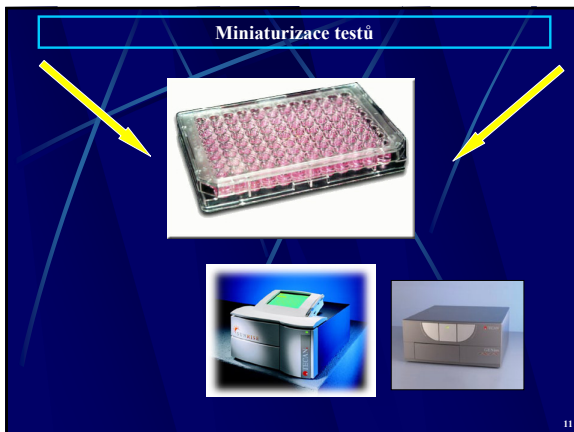
ECHA Biocide Monitor II.

Organismus	Bakterie - rodu <i>Bacillus</i> (G+).
Princip	Test je založen na použití malého absorpčního papírku, který je impregnován testovacím organismem a indikátorovým barvivem bakteriálního růstu (terazoliová sůl). Barvivo se redukuje v závislosti na koncentraci dehydrogenáz, které produkují přítomné bakterie. Vytvořená barva se interpretuje podle přiložené stupnice: toxický vzorek - bílá, růžová nebo tečkováná - jako mírně toxický, červená - netoxický, (Dutka a Gorrie 1989).
Trvání testu	Kontakty systému se vzorkem 10 sekund + 18-24 hodinová kultivace až do vytvoření barvy na proužku s kontrolním vzorkem.
Teplota	35 - 37 °C.

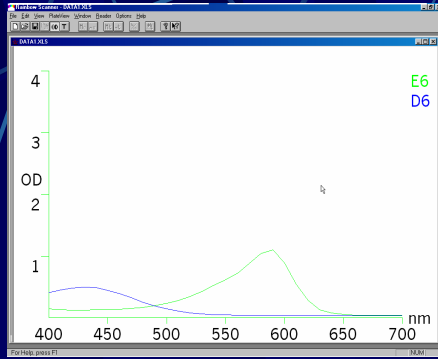
GIT – růstově inhibiční test (EN ISO 10712, ČSN 75 7730)

Turbidimetrický test – EN ISO 10712, ČSN 75 7730

Organismus	<i>Pseudomonas putida</i> (případně fluorescens) G-
Princip	Princípem tohoto testu je kultivace bakteriálního inokula v tekuté živné půdě se vzorkem. Se zvyšující se rychlostí růstu vzniká intenzivnější zákal. Průběh testu se sleduje měřením tohoto zákalu turbidimetricky (Dutka et Kwan, 1982). 18 hodinové bakteriální inokulum se naředí na požadovanou hustotu a nasazuje se do testovaných vzorků a kontroly ve zkumavkách. Po 16 hodinové kultivaci v termostatu se měří absorbance při 560 nm a vypočte se % inhibice mikrobiálního růstu ve srovnání s kontrolou. (Alternativní λ je 650 nm, která je optimální pro <i>Pseudomonas fluorescens</i>) (Dožkal et Soldán, 1988).
Reakční směs (V)	100 ml dle ČSN, případně nižší.
Předkultivace	18 hodin.
Trvání testu	16 ± 1 hodin (6).
Teplota	23 ± 1 °C.
Třepání	Urychluje průběh testu (není podmínkou).
Pozitivní kontrola	3, 5 - dichlorfenol.
Aseptická práce	Velmi limitující pouze při zakládání testu a při uchovávání kultury.
Doporučení	Finančně velmi výhodný test. Vhodný k testování odpadů - toxických vzorků bez vysokého zákalu a zabarvení.



Miniaturizace testů



13

Miniaturizace testů

SPECTRA Rainbow Thermo; Serial number: ; Firmware V2.03; XREAD PLUS Version: V 2.00

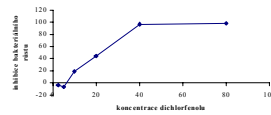
User comment: ; Measurement mode: Absorbance; Measurement filter: 610

Raw data:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.0470	0.0420	0.0450	0.0430	0.0670	0.0640	0.0720	0.0710	0.0670	0.0640	0.0590	0.0550
B	0.0550	0.0540	0.0570	0.0550	0.0740	0.0710	0.0730	0.0700	0.0680	0.0650	0.0600	0.0560
C	0.0420	0.0520	0.0480	0.0470	0.0700	0.0700	0.0660	0.0660	0.0620	0.0710	0.0800	0.0680
D	0.0430	0.0540	0.0570	0.0510	0.0680	0.0700	0.0670	0.0670	0.0640	0.0630	0.0760	0.0770
E	0.0420	0.0570	0.0500	0.0480	0.0650	0.0660	0.0710	0.0720	0.0680	0.0700	0.0680	0.0640
F	0.0710	0.0540	0.0510	0.0510	0.0820	0.0700	0.0680	0.0670	0.0650	0.0740	0.0650	0.0540
G	0.0730	0.0510	0.0500	0.0510	0.0720	0.0690	0.0710	0.0680	0.0670	0.0730	0.0700	0.0640
H	0.0740	0.0720	0.0700	0.0710	0.0820	0.0870	0.0710	0.0710	0.0690	0.0690	0.0690	0.0640

Měřené hodnoty v uživatelském rozhraní EXCEL.

Závislost inhibice růstu *Paradominus putida* na přítomnosti koncentraci - 3,5-dichlorfenolu



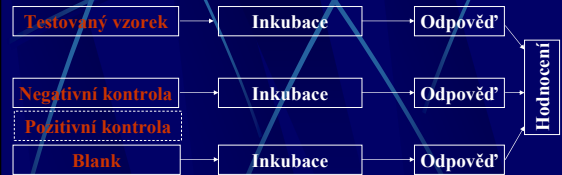
14

Postup



5

Vyhodnocení testů



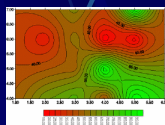
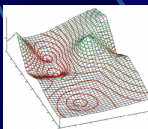
Aktivita (t1h) - Aktivita (t0h) v.s. negativní kontrola

$$\% \text{ inhibice (jako sledovaný efekt)} = [(A_{t1} - A_{t0}) / (A_{t1} - A_{t0})] * 100$$

Negativní kontrola: vóvek nahrazen rozpuštěním
Blank: není testovací kultura

16

Screeningové testy toxicity - aplikace testů na prokaryotických mikroorganismech

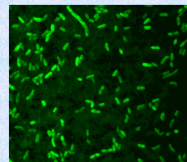


17

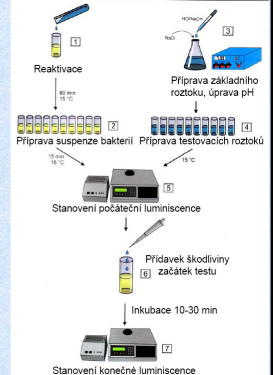
MICROTOX

MICROTOX - Akutní test toxicity (BioFix® Lumi)

Salinní bakterie *Vibrio fischeri* vykazující bioluminiscenci




- > redukce intenzity bioluminiscence vlivem působení škodliviny
- > vzorky: chemikálie, jejich směsi, odpadní vody, extrakty sedimentů a půd
- > dobře reprodukovatelný



18

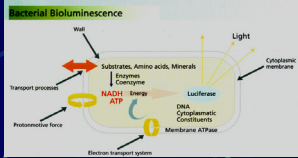
MICROTOX

Microtox	
Organismus	<i>Vibrio fischeri</i> (G-)
Princip	Jsou to testy na mořské luminiscenční bakterii <i>Vibrio fischeri</i> (ISO 11348 1998). Po proběhnutí expozice je měřeným parametrem inhibice bioluminiscence. Kinetika inhibice je nejčastěji sledována v následujících expozičních intervalech: 5, 15 a 30 minut s použitím jemné ředící řady vzorku 1:1. Vzorky by měly být před měřením upravovány: pH, salinita (2 ‰). Je-li hodnota pH v rozmezí od 6 - 8,5, není nutné pH upravovat (BioOrbit 1996). Při úpravě pH je nutné citlivě připravit roztok HCl či NaOH o takové koncentraci, která optimálně upraví pH roztoku co nejmenším objemem – tím lze zabránit nežádoucímu naředění vzorku. Celý test probíhá při teplotě 15 °C. Test má také variantu "solid phase".
Reakční směs (V)	1 ml. Poměr vzorek:inokulum je 500:500 µl, případně i 800:200 µl.
Předkultivace	10 – 15 minutová resuscitace vofilizované bakterie (15 °C).
Trvání testu	5, 10, 15, 20, 30 minut. Sleduje se jen jeden endpoint, nebo kinetická odpověď bakterie v několika zvolených intervalech.
Teplota	15 °C.
pH	Optimum 6 – 8,5 pH.
Třepání	Ne.
Pozitivní kontrola	ZnSO ₄ .
Aseptická práce	Není nutná.



19

MICROTOX

$$\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + 0,1 \text{ h}$$


- Emise světla je silně exergonický proces.

- Celkový kvantový výtěžek bioluminiscence, tj. počet kvant vyzářených na jednu molekulu spotřebovaného substrátu, činí asi 0,1.

- Bioluminiscenční systém je vlastně boční větví elektronů ve flavoproteinové části aerobního respiračního řetězce.

- Mezi oběma větvemi toku elektronů existuje soutěživý vztah. Přitom afinita luciferázového systému ke kyslíku je větší než systému respiračního, takže při nedostatku kyslíku klesá rychlost respirace, a to až na 10 % maximální rychlosti, aniž je dotčena intenzita luminiscence.

20

MICROTOX

ČSN EN ISO 11348-1)

Název normy:

Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi,

Třídící znak: 757734

Vydána: leden 2000

21

Mutatox

Mutatox	
Organismus	Využívání bakterie <i>Vibrio fischeri</i> - „dark mutant“ - za normálních podmínek neluminesce (G-).
Princip	Jedná se o mutanta, u kterého je emise světla způsobena až reverzní mutací za přítomnosti mutagenických látek (Ulitzur et al. 1980). Lyofilizované bakterie jsou rehydratovány a exponovány toxickou látkou. Po 16-24 hodinách se měří emise světla luminometrem. Test je prováděn s i bez enzymové aktivace S9. Použití +S9 je popsáno v práci Johnson 1992.
Reakční směs (V)	500 µl.
Předkultivace	30 minut v 37 °C vodní lázni.
Trvání testu	16 – 24 h.
Citlivost	Dodání S9 směsi má tendenci zvýšit detekční limit a snížit jednotnost výsledků, což může být vysvětleno nestandardními podmínkami pro metabolizaci (bakterie vyžaduje jen 15 °C, zatímco S9 směs byla vyvinuta pro Ames test při 37 °C). Výsledky Mutatoxu také může interferovat cytotoxicita (stejný případ i u Ames testu). Zde se však může provést jako kontrola populačně růstový test založený na buněčné hustotě (Willemsen et al. 1995). Byla potvrzena vysoká 93 % shoda s Ames testem (Legault et al. 1994). Mutatox byl schopen z 82% správně odlišit (ne)karcinogenní látky ve srovnání s Ames testem, který měl tuto schopnost nižší (73%).
Teplota	22 ± 1 °C.
Třepání	Ne.
Pozitivní kontrola	2-AA, 2-AF, BaP.
Aseptická práce	Ano.
Doporučení	Test je doporučen provádět v kombinaci s Microtox testem, který mu musí předcházet (Hausser et al. 1997).

22

ATP – TOX system

- ATP-TOX system využívá měření aktivity buněčné ATP jako indikátoru růstové inhibice.
- Adenosin trifosfát je velmi důležitá, vysoce energetická sloučenina, kterou syntetizují živé organismy v buňkách pro ukládání lehké přenosné energie. Ta je využívána v buňkách v místě aktuální potřeby. Pokud buňka začne z jakékoliv důvodů snižovat intenzitu metabolismu, lze citlivě pozorovat snížení tvorby ATP (až by došlo k úplnému odumření buňky).
- Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminiscence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořčičnatých iontů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo Fasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách.

$$\text{luciferáza}$$

$$\text{luciferin} + \text{ATP} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{luciferáza}} \text{oxyluciferin} + \text{AMP} + \text{PPi} + \text{CO}_2 + \text{světlo} (-562 \text{ nm})$$

Mg²⁺

- 18-24 hodinová buněčná kultura se naředí na potřebnou hustotu a přidá se k jednotlivým koncentracím testovaného vzorku. Zkoumavky se inkubují na rotační třepače po dobu 5 hodin a po té se měří celková množství vyprodukované ATP pomocí luciferin-luciferázové aktivity (dávající se luciferin-luciferázový roztok do testovací směsi) na luminometru. Vzorek může inhibovat schopnost přidávané luciferázy měřit produkci ATP, proto je třeba ještě ověřit, zda tento jev nenastal. Celý postup měření je stejný jako u ATP, ale místo bakteriální kultury se používá sterilní médium stejného obsahu, jako je v bakteriálním inokulu. Testování vzorků, které způsobují vyšší inhibici luciferázové aktivity, by mělo být zopakováno s podrobnějším ředěním.

23

ATP – TOX system

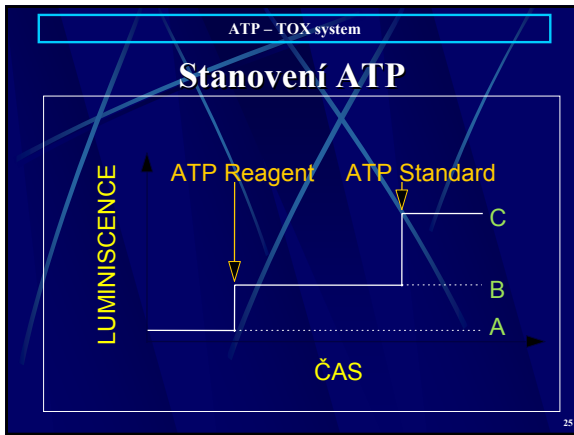
Extrakce ATP

= „rozbití“ buněčné stěny a uvolnění buněčného obsahu včetně ATP

extrakční činidla: TCA, H₂SO₄, detergent - benzethonium chlorid, DMSO...

možná inhibice luciferázy extrakčním činidlem ---> nutné ředění (TCA) nebo neutralizace (benzethonium chlorid, H₂SO₄)

24



25

ATP – TOX system

ATP-TOX systém	
Organismus	Libovolná kultura.
Princip	ATP-TOX systém využívá měření aktivity buněčné ATP jako indikátoru růstové inhibice. Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminescence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořčičných iontů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo řasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách (Duka 1988). Zkumavky se inkubují na rotační třepače po dobu 5 hodin a po té se měří celkové množství vyprodukované ATP pomocí luciferin-luciferázové aktivity (dodává se luciferin-luciferázový roztok do testované směsi) na luminometru. Vzorek může inhibovat schopnost přidané luciferázy měřit produkci ATP, proto je třeba ještě ověřit, zda tento jev nenastal.
Reakční směs (V)	1 ml. (200 ul roztoku enzymu + 800 ul vzorku)
Předkultivace	Závisí na typu kultivovaných buněk (18-24)
Trvání testu	Po proběhnutí expozice se provede rozrušení stěn buněk (činidlem – TCA, trichloroctová kyselina, sono – ultrazvuk). Tím dojde k uvolnění ATP do roztoku, ze kterého se odeberá 800 ul vzorku do reakční směsi.
Teplota	Závislá na vybrané kultuře.
Třepání	Doporučené.
Pozitivní kontrola	Chemické látky musí být vybírány s ohledem na možnou inaktivaci enzymu (viz princip).
Aseptická práce	Ano

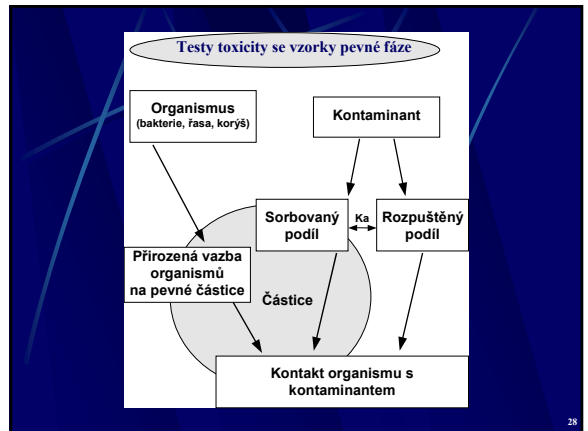
26

ATP – TOX system

Automatický BIOSENZOR

Results in 30 Seconds!

27



28

Dehydrogenázní aktivita

Expozice bakterie probíhá přímo ve vzorku pevného skupenství. Její metabolický stav je hodnocen pomocí měření aktivity dehydrogenáz. Suspenze buněk *B. cerea* spektrofotometriky ověřené koncentrace je přidána do suspenze vody a pevného vzorku.

Po inkubaci (2h, 70 rpm, 25° C) je do suspenze přidán resazurin (oxido-redukční barvivo indikující aktivitu bakteriální dehydrogenázy) ve fosforenanovém pufru. Po 15 min. je směs zcentrifugována a reakce přerušena filtrací supernatantu přes membránový filtr (velikost pórů 0.2 mm). Zredukovaný resazurin mění barvu, je tudíž možné měřit jeho přeměny spektrofotometriky kvantifikovat.

inkubace (2h, 70 rpm, 25 °C)
+ resazurin

29

Dehydrogenázní aktivita

Resazurin

$\lambda_{max} = 601,2nm$

modrofialová barva

Resorufin

$\lambda_{max} = 571,4nm$

růžová barva

30

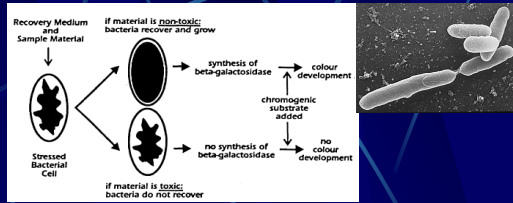
Test na aktivitu dehydrogenáz

Test na aktivitu dehydrogenáz

Organismus	<i>Bacillus cereus</i> , G+, (CCM 2010).
Princip	Jedná se o test, ve kterém je aplikována sbírková kultura bakterie <i>Bacillus cereus</i> přímo do vzorku pevného skupenství a její poškození se sleduje pomocí spektrofotometrického měření změn v množství specifického substrátu resazurinu (601nm), jehož redukce je úměrná změnám v aktivitě dehydrogenáz sledované buněk. Alternativou odečtu výsledků je spektrofotometrická detekce vznikajícího resorufinu (571nm). (Römpagel et al. 1995).
Reakční směs (V)	6 ml.
Předkultivace	18 hodin při kontinuálním třepání (220 rpm) při teplotě 21 °C, (OD ₆₀₀ = 0,4).
Trvání testu	4 hodiny.
Teplota	21 °C.
Třepání	Kontinuální třepání 70 rpm.
Aseptická práce	Pouze při práci se zásobní kulturou.
Výhody	Bezextrakční test matrice pevného skupenství. Tato metoda testuje účinky i těch kontaminantů, které jsou vázány na povrch pevných částicěk píků a sedimentů. Výhodou je jeho metodická „benevolentnost“ k přítomnosti kyslíku a dobrá rozpustnost resorufinu ve vodě a tím jeho jednoduchá extrahovatelnost.

31

Toxi - Chromotest™



The activity of the induced (by cocktail containing a specific inducer of β -galactosidase) enzyme is detected by the hydrolysis of a chromogenic substrate

It is sensitive to a wide spectrum of toxic substances such as **heavy metals**, and **organic and inorganic pollutants**, and may be used to detect the presence of toxicants in **water and soil/sediment extracts**

If the sample is not toxic, a distinctive **blue (or yellow) colour** quickly develops

32

Toxi - Chromotest™

Přehled v praxi nejčastěji používaných substrátů pro stanovení beta-galaktosidázy:

- ONPG BEZBARVÁ - ŽLTÁ
 - CPRG NAŽLOUTLÁ - ČERVENÁ
 - X-GAL ŽLTÁ - MODRÁ
- Chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside, monosodium salt
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, crystals

33

Toxi - Chromotest™

Organismus	<i>Escherichia coli</i> - gramnegativní (G-), K12 ORSS.
Princip	Princip obou testů je založen na schopnosti toxikantů inhibovat de novo syntézu β -galaktosidázy v kmeni <i>Escherichia coli</i> , mutantu citlivému především k pesticidům, mykotoxinům a těžkým kovům (Kilroy et Gray 1995). <i>Toxi-Chromotest</i> je mikrobiologický test, který slouží k testování kapalných vzorků a roztoků chemických látek. Při <i>ToxiChromoPad</i> variantě test probíhá ve zkumavkách. Vzorky se pak aplikují na filtrační papíry se substrátem impregnovaným (test pro sedimenty, písky). Lyofilizované bakterie jsou elzovým směsí živého média a specifického induktoru pro fenotypovou produkci enzymu. Jsou následně smíchány s testovaným vzorkem, který může inhibovat obnovovací proces a syntézu β -galaktosidázy. Směs je u <i>Toxi-Chromotestu</i> namáčena do serologických desek a množství enzymu je stanoveno semikvantitativně kolorimetrickou reakcí nebo může být kvantifikováno na třech zařízeních pro detekci (Reinhardt et al. 1987). V případě <i>ToxiChromoPadu</i> jsou výsledky hodnoceny jen srovnáním výtvarné kontrolní barvy na filtračním papíru s variantou vzorku (EBPI, 1995). (Kwan 1993, Kwan 1995, Rao et al., 1991).
Citlivost	Kwan et Dutka 1990 srovnávali tyto testy s <i>Microtox</i> testem. Především u vzorků sedimentů jsou tyto testy méně citlivé, než <i>Microtox</i> . Například u mykotoxinů a pesticidů byl <i>ToxiChromotest</i> citlivější (Kilroy et Gray 1995).
Reakční směs (V)	U <i>Toxi-ChromoPadu</i> je reakční směs 500 μ l, u klasické mikrobiologické verze <i>Toxi-chromotestu</i> 250 μ l.
Předkultivace	Dostatečná doba resuscitace: 10 minut.
Aseptická práce	Aseptická práce je nutná při jakékoliv manipulaci se zásobní kulturou.
Trvání testu	2 hodiny.
Teplota	37 °C

34

Toxichromo-Pad®

Ukázka KITu na stanovení toxicity v pevné matrici



Toxichromo-test®

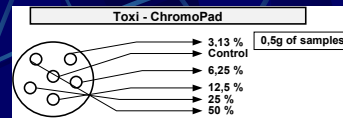
Ukázka KITu na stanovení toxicity v kapalných matricích



<http://www.ebpi-kits.com/>

35

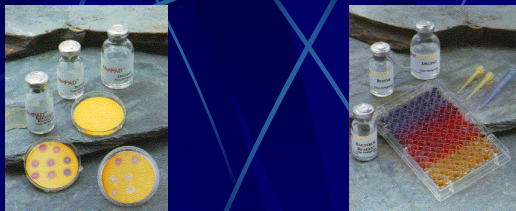
Toxi - ChromoPad™



36

MetPad, MetPlate, FluoroMetPlate, MetSoil

MetPad MetPlate



Enzymová inhibice syntézy B-galaktosidázy

35°C, 90 min., rehydratace lyofilizované kultury

- specifita na těžké kovy X velmi slabá reakce na znečištění organickými polutanty
- test provádět vždy v kombinaci s jiným testem,
- FluoroMetPlate - fluorogenní substrát (nejcitlivější z celé skupiny,

37

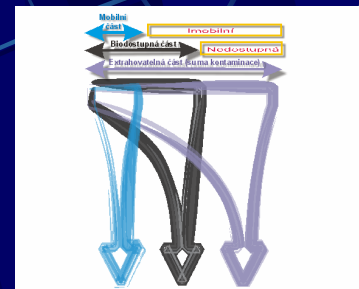
MetPlate

MetPlate	
Organismus	<i>Escherichia coli</i> (G-)
	Princip těchto testů je obdobný jako u Toxi-Chromotestu. Bakteriální odpovědi na toxický vzorek je měřena indukovaná syntéza enzymu β -galaktosidázy mutantního kmene <i>E. coli</i> (Bitton et al. 1992, Kong et al. 1995). Intenzita syntézy enzymu je závislá na metabolismu buněk.
Reakční směs (V)	1 ml (100 μ l inokula + 900 μ l vzorku)
Trvání testu	1 hodinu.
Teplota	35 °C.

38

Testy vzorků pevné fáze

TREND:

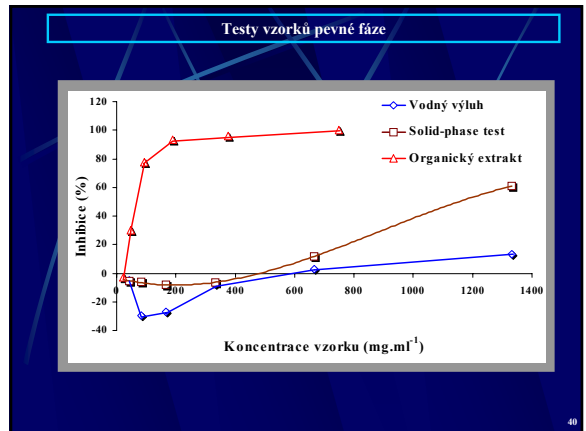


Mobilní část
 Bioaktivní část
 Extrahovatelná část část kontaminace

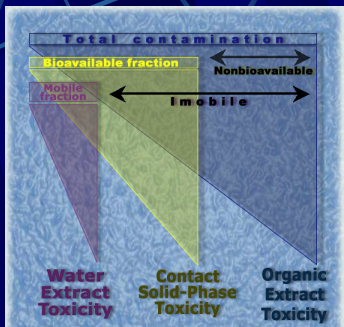
Imobilní část
 Nedisponibilní část
 Extrahovatelná část část kontaminace

Toxicita vodného výluhu - ve vodě rozpustná (mobilní) část kontaminace
 Kontaktní test toxicity - biodostupná část kontaminace
 Toxicita organického extraktu - celková (extrahovatelná část) kontaminace

39



Testy vzorků pevné fáze – DOPORUČENÍ DO BUDOUCNA



Total contamination

Bioavailable fraction

Mobile fraction

Nonbioavailable

Imobile

Water Extract Toxicity

Contact Solid-Phase Toxicity

Organic Extract Toxicity

41

Hodnocení bakteriálních testů

Výhody	Nevhody
nízká finanční a časová náročnost	jednobuněčný organismus
citlivost	testování extraktů
uchovávání a příprava testovacích organismů	vliv zákalů vzorků
miniaturizované provedení	pouze akutní účinky
instrumentální metody	laboratorní podmínky
	omezená extrapolace výsledků

42

Trendy ve vývoji bakteriálních testů

standardizace metod
miniaturizace provedení
moderní instrumentální analytické metody
SPT testy (testování účinků biodostupné frakce)
biosensory

43

Zařazení do baterie testů

Dle cíle hodnocení
a dle typu vzorku

Aspekt trofické úrovně
testovaného organismu

Minimální výběr:
- bakterie
- řasy
- bezobratlí

44