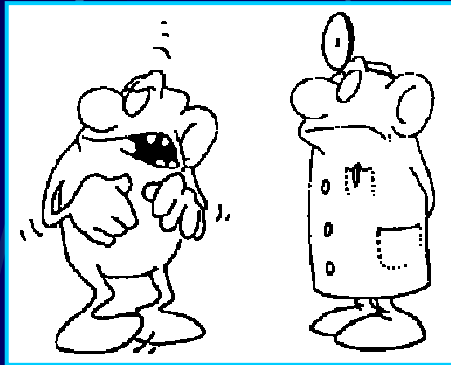




Ekotoxikologické biotesty

„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

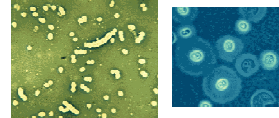
2010 Přednášející: Pavel Čupr

Procaryotes

- ◆ 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.

Special stains

- ◆ Capsule stain



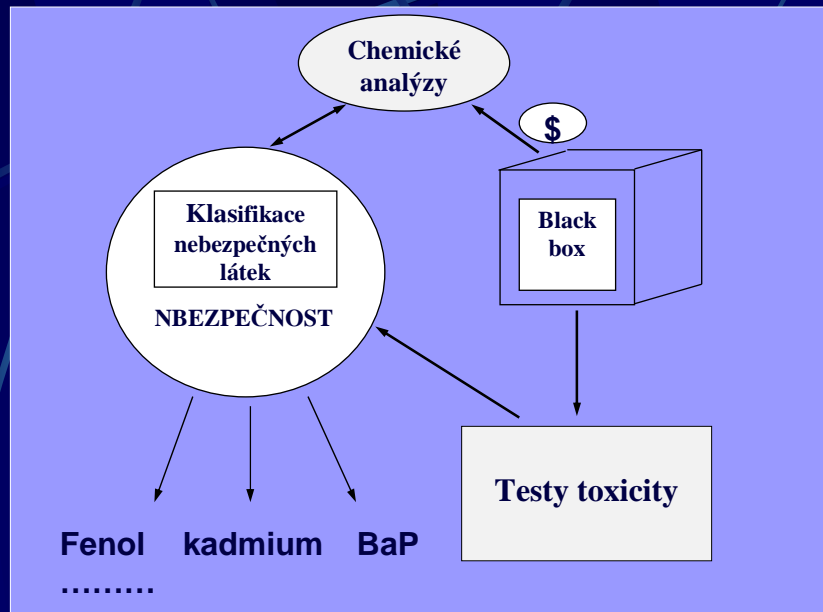
Shapes of Procaryotes

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

Procaryotes

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

❖ Správné nasazení testů toxicity ❖



3

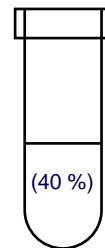
TEST TOXICITY: experimentální design

**BIOTA
(bakterie)**

+

**KONTAMINANT
vzorek z ŽP**

- Testy jsou prováděny v adekvátní ředící řadě!
- Biologický materiál jen ve stejné kvalitě,
- Standardní podmínky testu.



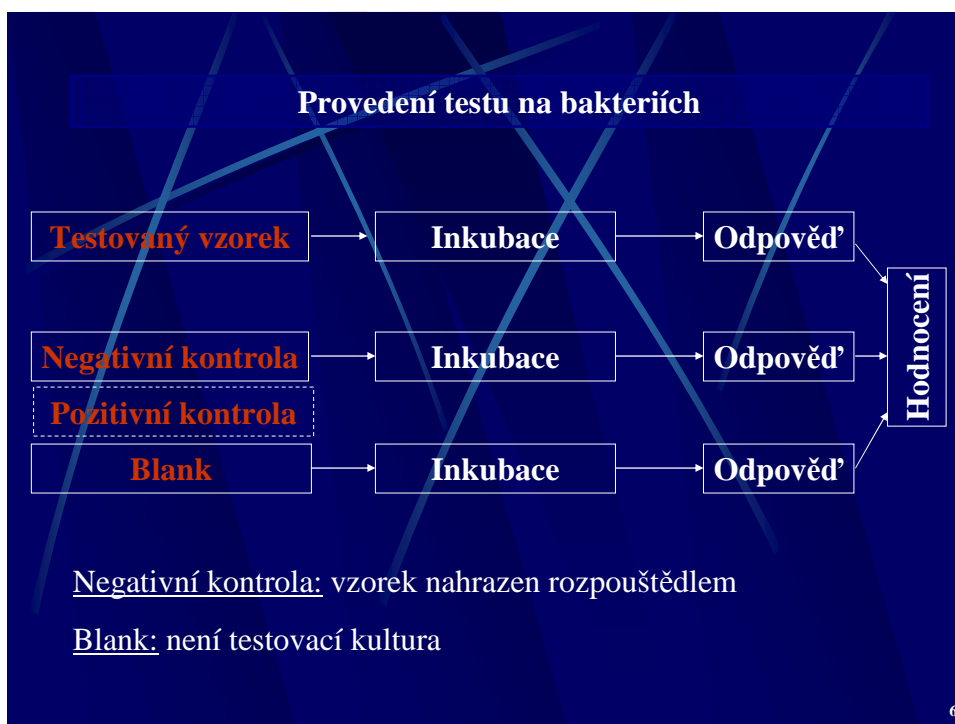
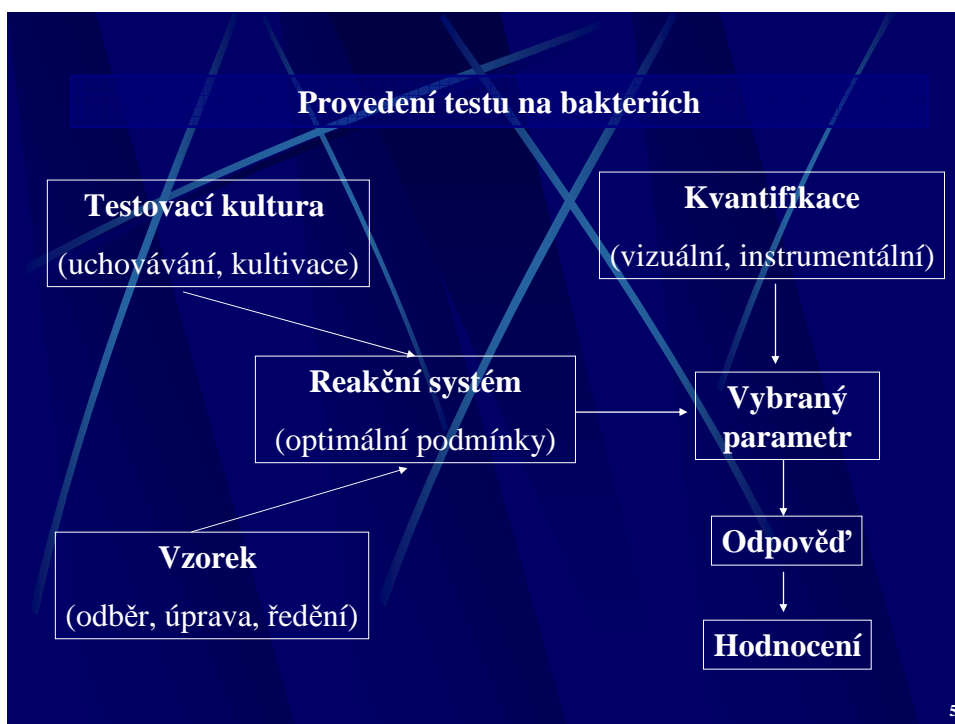
- co nejméně ředit vzorek (80 %) – “falešná nezávadnost”

? EFEKT ?

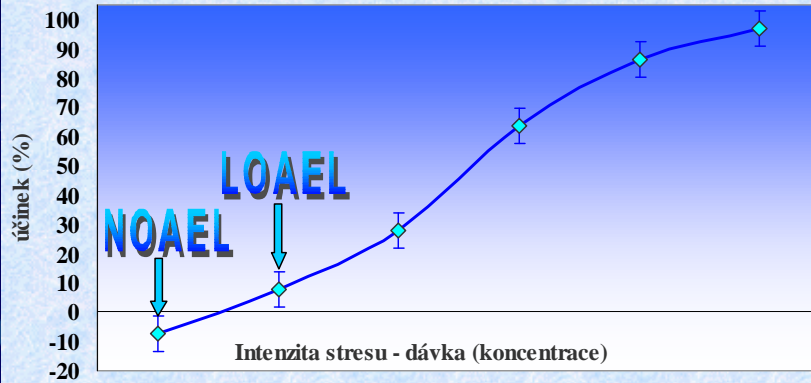
+ -

LOEC, NOEC, EC_{50} , IC_{50} ,...

4



vztah "dávka - účinek"

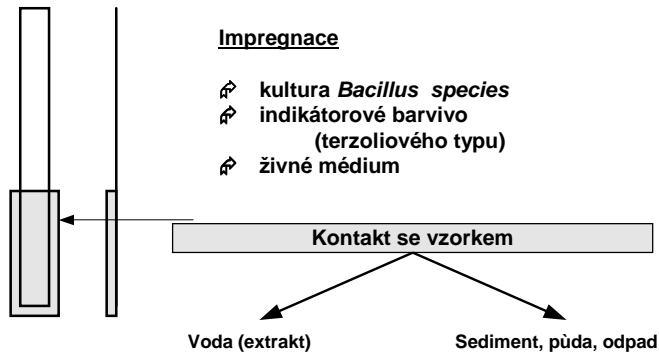


Převzato z metodického návodu Guidelines for E.R.A. (U.S. EPA 1998).

- Všechny testy toxicity i genotoxicity by měly být aplikovány v experimentech typu „dávka-odpověď“. Vzhledem k velmi obdobnému tvaru těchto funkčních závislostí pro téměř všechny navrhované biologické systémy lze vymezit obecné principy hodnocení výstupů.
- Kvantifikované parametry získané z křivek „dávka-odpověď“ doplněné relevantními mírami variability jsou vstupem do procesu posuzování rizika.

7

ECHA BIOCIDES Monitor



10 s kontakt se vzorkem

18 - 24 hodin inkubace (dle typu použité bakterie) 35-37 °C

Bílá	Růžová (tečkovaná)	Červená
Toxický	Mírně toxický	Netoxický

8

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 (tetrazoliová sůl). Barvivo se redukuje v závislosti na koncentraci dehydrogenáz, které produkují přítomné bakterie. Vyvinutá barva se interpretuje podle přiložené stupnice: toxický vzorek - bílá, růžová nebo tečkovaná - jako mírně toxický, červená - netoxický, (Dutka a Gorrie 1989).
Trvání testu	Kontakt systému se vzorkem 10 sekund + 18-24 hodinová kultivace až do vytvoření barvy na proužku s kontrolním vzorkem.
Teplota	35 – 37 °C.

9

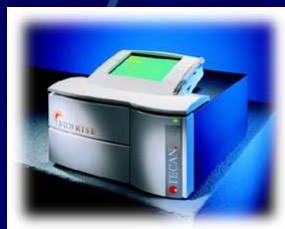
GIT – růstově inhibiční test (EN ISO 10712, ČSN 75 7730)

Turbidimetrický test – EN ISO 10712, ČSN 75 7730

Organismus	<i>Pseudomonas putida</i> (případně <i>fluorescens</i>) G-.
Princip	Principem 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>) (Dočkal 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	Úrychluje průběh testu (není podmínkou).
Pozitivní kontrola	3, 5 – dichlorfenol.
Aseptická práce	Velmi limitující pouze při zakládání testu a při uchování kultury.
Doporučení	Finančně velmi výhodný test. Vhodný k testování odpadů – toxických vzorků bez vysokého zákalu a zbarvení.

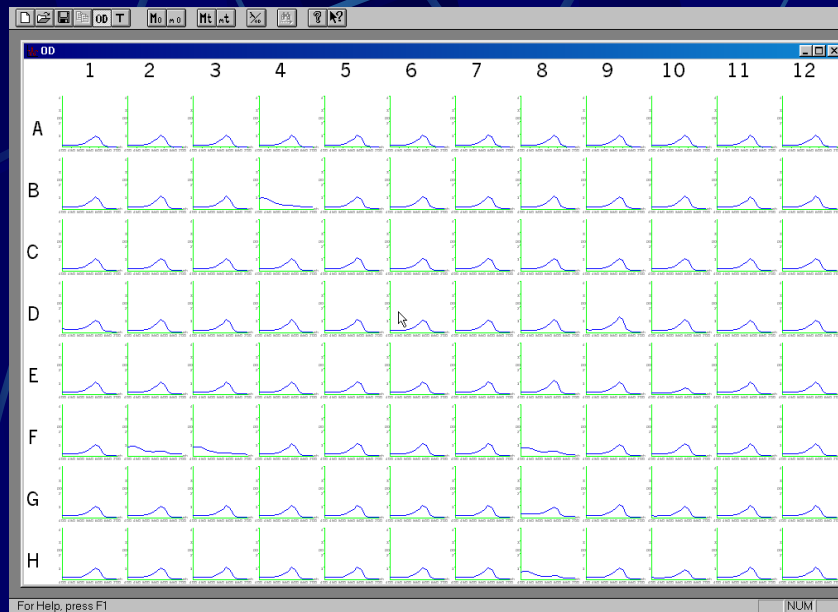
10

Miniaturizace testů



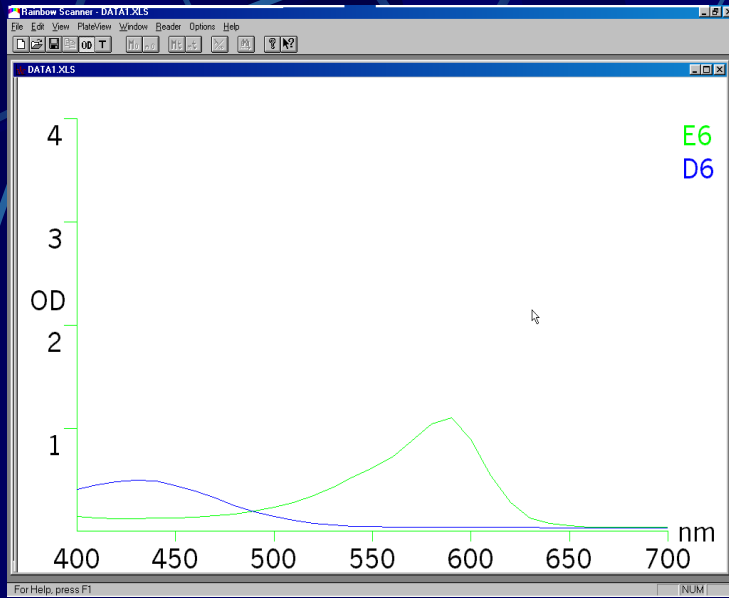
11

Miniaturizace testů



12

Miniaturizace testů



13

Miniaturizace testů

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

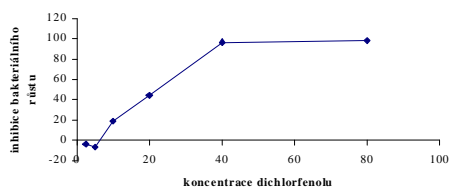
User comment:
 Measurement mode: Absorbance
 Measurement filter: 610

Raw data

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0670	0,0650	0,0650	0,0680	0,0670	0,0680	0,0720	0,0750	0,0710	0,0670	0,0680	0,0590
B	0,0550	0,0560	0,1870	0,1650	0,1940	0,1470	0,1150	0,0670	0,0640	0,0800	0,0710	0,0610
C	0,0620	0,0520	0,1680	0,1670	0,1700	0,1500	0,1280	0,0660	0,0620	0,0710	0,0800	0,0600
D	0,0630	0,0560	0,1570	0,1910	0,1680	0,1530	0,1250	0,0670	0,0680	0,0830	0,0760	0,0570
E	0,0620	0,0570	0,2100	0,0880	0,0650	0,0660	0,0750	0,0720	0,0650	0,0780	0,0680	0,0650
F	0,0710	0,0560	0,2150	0,0910	0,0820	0,0700	0,0680	0,0670	0,0650	0,0740	0,0650	0,0540
G	0,0730	0,0550	0,2050	0,0810	0,0720	0,0690	0,0750	0,0680	0,0670	0,0750	0,0790	0,0610
H	0,0780	0,0750	0,0780	0,0640	0,0780	0,0620	0,0670	0,0730	0,0730	0,0690	0,0690	0,0610

Měřené hodnoty v
uživatelském rozhraní EXCEL

Závislost inhibice růstu *Pseudomonas putida* na
přítomné koncentraci - 3,5-dichlorfenol



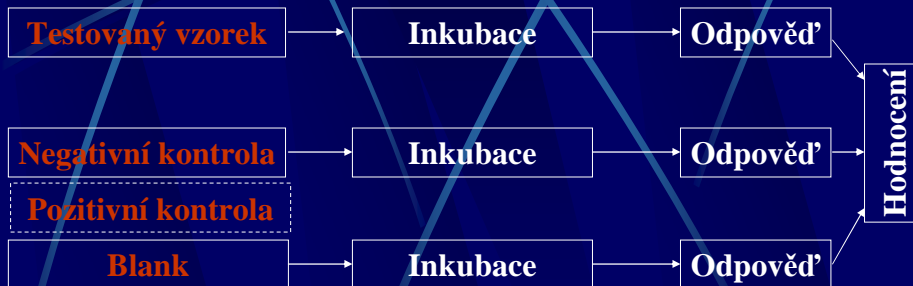
14

Postup



5

Vyhodnocení testů



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

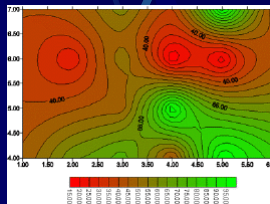
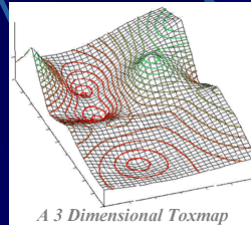
% inhibice (jako sledovaný efekt) = $[(At1 - At0) / (Akt1 - Akt0)] * 100$

Negativní kontrola: vzorek nahrazen rozpouštědlem

Blank: není testovací kultura

16

Screeningové testy toxicity - aplikace testů na prokaryotických mikroorganismech

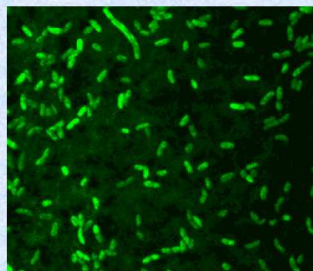


17

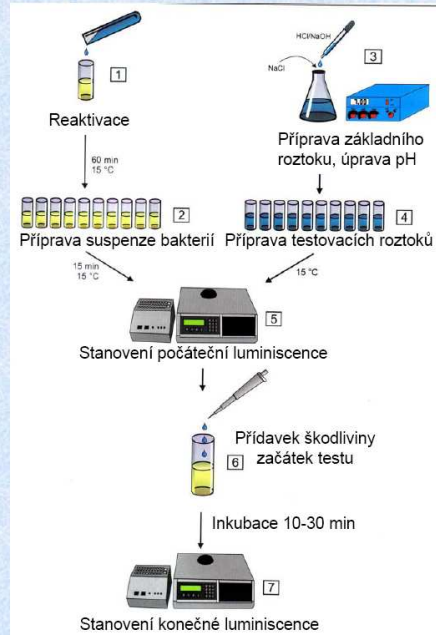
MICROTOX

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



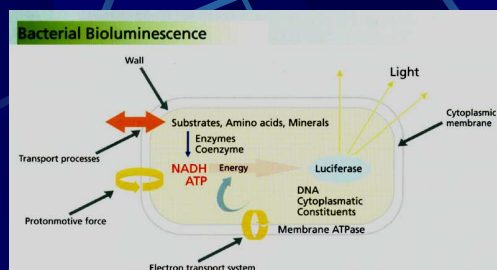
MICROTOX

Microtox	
Organismus	<i>Vibrio fischeri</i> (G-)
Princip	<p>Jsou to testy na mořské luminiscenční bakterii <i>Vibrio fischeri</i> (ISO 11348 1998). Po proběhlé expozici je měřeným parametrem inhibice bioluminiscence. Kinetika inhibice je nejméně sledována v následujících expozičních intervalech: 5, 15 a 30 minut s použitím jemné ředící řady vzorku 1:1.</p> <p>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).</p> <p>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".</p>
Reakční směs (V)	1 ml. Poměr vzorek:inokulum je 500:500 µl, případně i 800:200 µl.
Předkultivace	10 – 15 minutová resuscitace lyofilizované 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



- 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 neluminuje (G-).
Princip	Jedná se o mutanta, u kterého je emise světla způsobena až reverzní mutací za přítomnosti mutagenních 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, aplikace bez -S9 v článku Kwan et al. 1990.
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). S 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	23 ± 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 (Hauser 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 lehce přenosné energie. Ta je využívána v buňkách v místě aktuální potřeby. Pokud buňka začne z jakýchkoliv důvodů snižovat intenzitu metabolismu, lze citlivě pozorovat snížení tvorby ATP (aniž 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 řasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách:

luciferáza

- luciferin + ATP + O₂ -----> oxyluciferin + AMP + PPi + CO₂ + světlo (~562 nm)

Mg²⁺

- 18-24 hodinová buněčná kultura se naředí na potřebnou hustotu a přidá se k jednotlivým koncentracím testovaného vzorku. Zkumavky se inkubují na rotační třepače po dobu 5 hodin a po té se měří celkové množství vyprodukované ATP pomocí luciferin-luciferázové aktivity (dožívá 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. 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

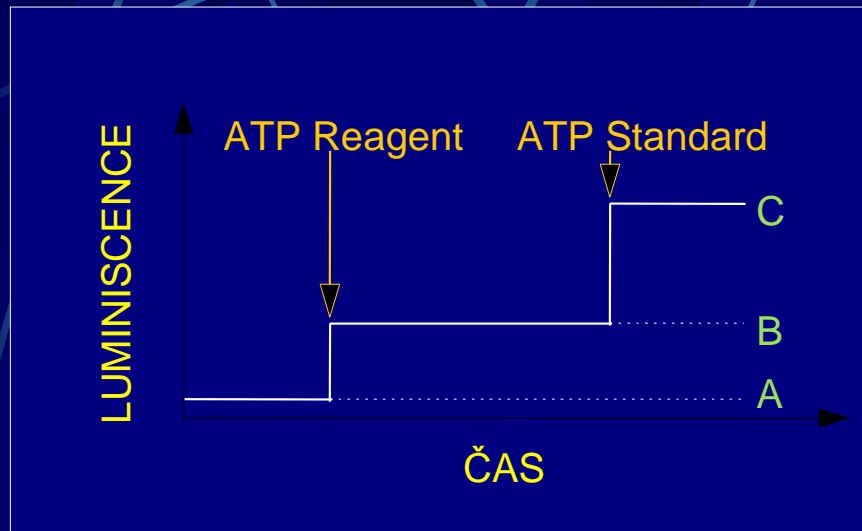
= „rozbití“ buněčné stěny a uvolnění buněčného obsahu včetně ATP

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

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

24

Stanovení ATP



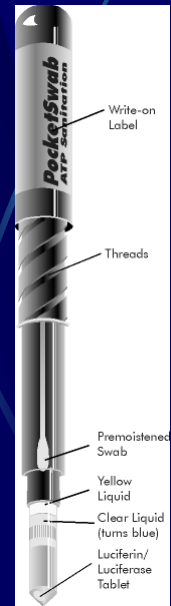
25

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 hořečnatých iontů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo řasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách (Dutka 1988). Zkumavky se inkubují na rotační třepačce 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 proběhlé expozici se provede rozrušení stěn buněk (čínidlem – TCA, trichloroctová kyselina, sono – ultrazvuk). Tím dojde k uvolnění ATP do roztoku, ze kterého se odebírá 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

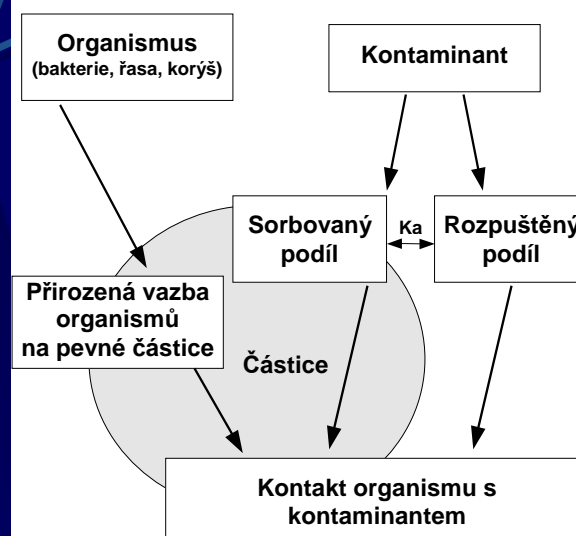
ATP – TOX system

Automatický BIOSENZOR



27

Testy toxicity se vzorky pevné fáze



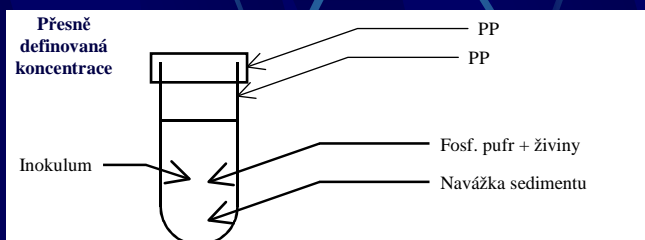
28

Dehydrogenázní aktivita

Expozice bakterie probíhá přímo ve vzorku pevného skupenství.

Její metabolický stav je hodnocen pomocí měření aktivity dehydrogenáz. Suspenze buněk *B. cerea* spektrofotometricky ověřené koncentrace je přidána do suspenze vody a pevného vzorku.

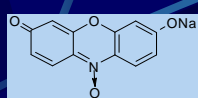
Po inkubaci (2h, 70 rpm, 25 °C) je do suspenze přidán rezazurin (oxido-redukční barvivo indikující aktivitu bakteriální dehydrogenázy) ve fosforečnanovém pufru. Po 15 min. je směs zcentrifugována a reakce přerušena filtrací supernatantu přes membránový filtr (velikost pórů 0,2 mm). Zredukovaný rezazurin mění barvu, je tudíž možné míru jeho přeměny spektrofotometricky kvantifikovat.



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

29

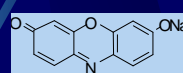
Dehydrogenázní aktivita



Resazurin

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

modrofialová
barva



Resorufin

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

růžová barva

30

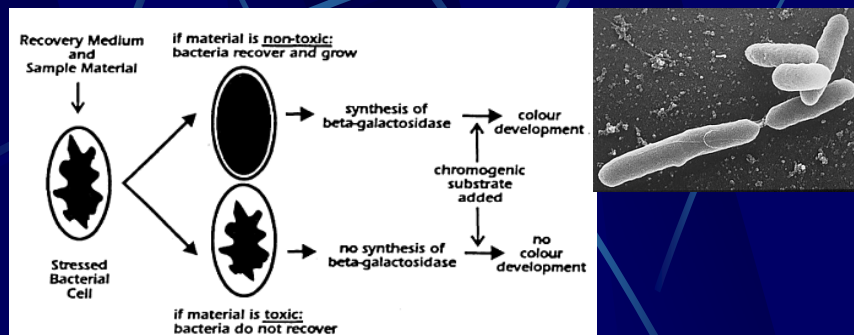
Test na aktivitu dehydrogenáz

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). (Rönnpapel et al. 1995).
Reakční směs (V)	6 ml.
Předkultivace	18 hodin při kontinuálním třepání (220 rpm) při teplotě 21 °C, ($OD_{601}=0,4$).
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 částicek půd 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 - ŽLUTÁ
- CPRG NAŽLOUTLÁ - ČERVENÁ
- Chlorophenol red-beta-D-galactopyranoside, monosodium salt
- X-GAL ŽLUTÁ - MODRÁ
- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, crystals

33

Toxi - Chromotest™

<i>Toxi-Chromotest, Toxi-ChromoPad</i>	
Organismus	<i>Escherichia coli</i> , gramnegativní (G-), K12 OR85.
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 mikrodestičkový 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 substrátovou impregnací (test pro sedimenty, půdy). Lyofilizované bakterie jsou oživeny směsí živného 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> nanášena do serologických destiček a množství enzymu je stanoveno semikvantitativně kolorimetrickou reakcí nebo může být kvantifikováno na čtecím zařízení pro destičky (Reinhart et al. 1987). V případě <i>ToxiChromoPadu</i> jsou výsledky hodnoceny jen srovnáním vytvořené kontrolní barvy na filtračním papíře 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> . Naopak 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 mikrodestičkové 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 ®

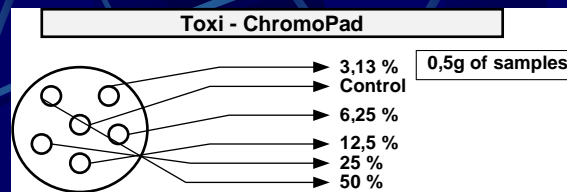
Ukázka KITu na stanovení toxicity v kapalně matrici



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

35

Toxi - ChromoPad™



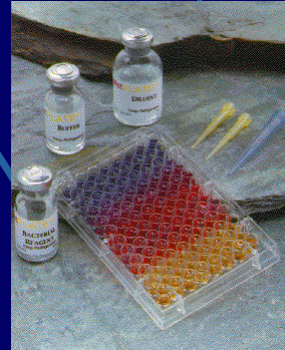
36

MetPad, MetPlate, FluoroMetPlate, MetSoil

MetPad



MetPlate



Enzymová inhibice syntézy B-galaktozidázy

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

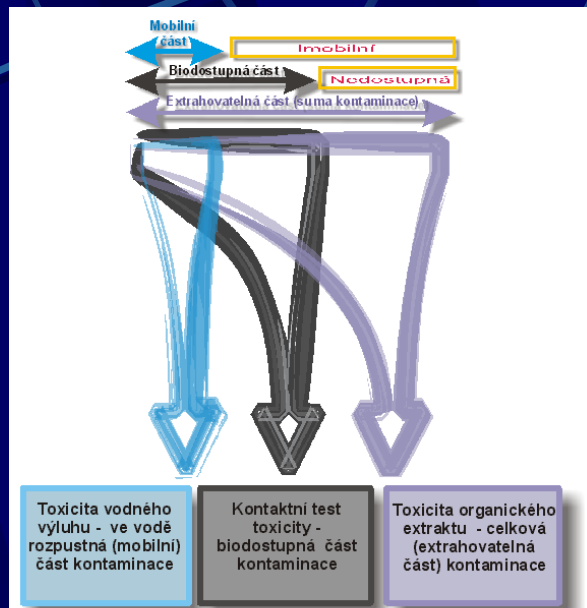
MetPlate

MetPlate	
Organismus	<i>Escherichia coli</i> (G-).
	Princip těchto testů je obdobný jako u Toxi-Chromotestu. Bakteriální odpověď na toxický vzorek je měřená indukovaná syntéza enzymu β – galaktozidázy 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

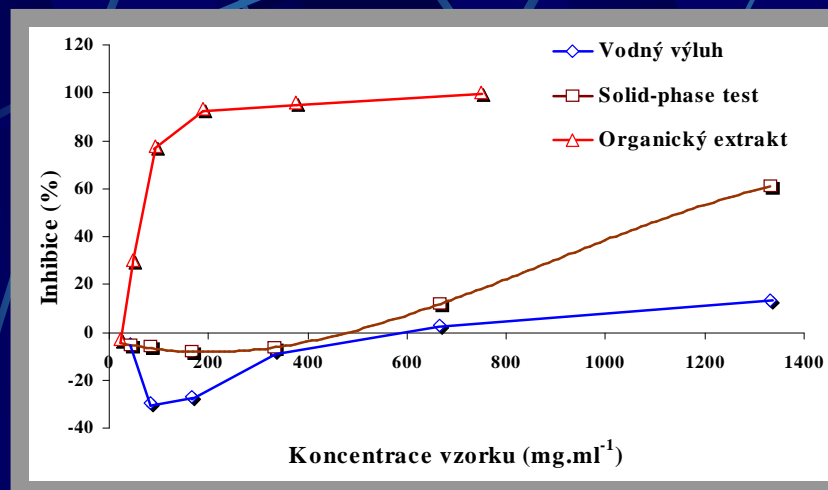
Testy vzorků pevné fáze

TREND:



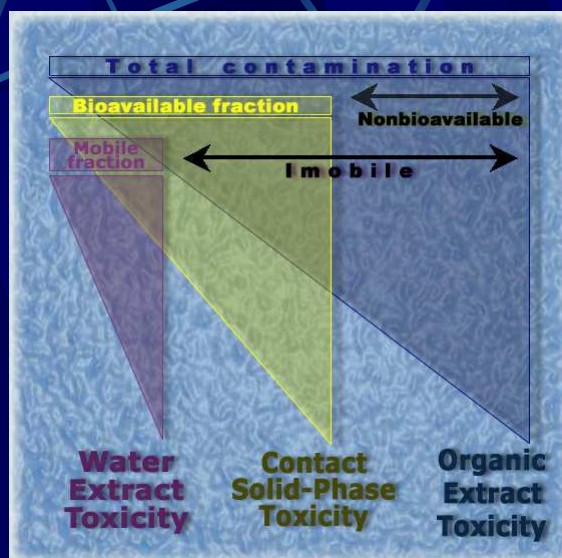
39

Testy vzorků pevné fáze



40

Testy vzorků pevné fáze – DOPORUČENÍ DO BUDOUCNA



41

Hodnocení bakteriálních testů

Výhody

nízká finanční a časová náročnost
citlivost
uchovávání a příprava testovacích organismů
miniaturizované provedení
instrumentální metody

Nevýhody

jednobuněčný organismus
testování extraktů
vliv zákalu vzorků
pouze akutní účinky
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