

Centrum pro výzkum
biologických látek
v prostředí

Ekotoxikologické biotesty Testy ekotoxicity s destruenty

2011

Pavel Čupr
cupr@recetox.muni.cz



esf evropský sociální fond v ČR EVROPSKÁ UNIE MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost UNIVERZITA PAVLA DOBROŠE

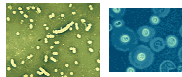
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

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 status
◆ Capable of state

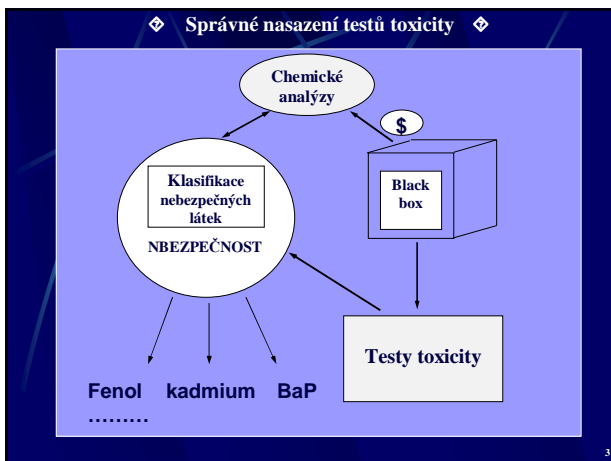


Shapes of Procaryotes

- ◆ Cocci: round
 - diplococci ●●
 - streptococci ●●●●
 - tetrads-groups of 4 ●●●●
- ◆ Rods: cocco bacilli —
- ◆ 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




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***

4

Provedení testu na bakteriích

Testovací kultura
(uchovávání, kultivace)

Kvantifikace
(vizuální, instrumentální)

Reakční systém
(optimální podmínky)

Vzorek
(odběr, úprava, ředění)

Vybraný parametr

Odpověď

Hodnocení

5

Provedení testu na bakteriích

Testovaný vzorek

Inkubace

Odpověď

Negativní kontrola

Inkubace

Odpověď

Pozitivní kontrola

Inkubace

Odpověď

Blank

Inkubace

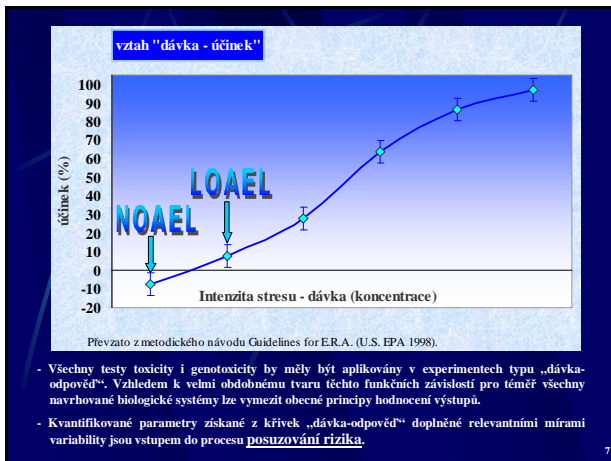
Odpověď

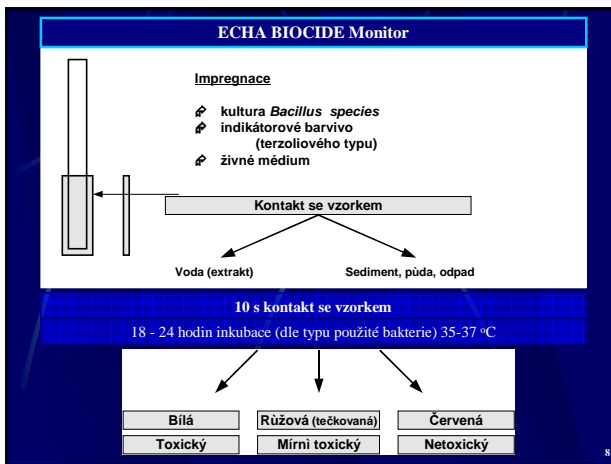
Hodnocení

Negativní kontrola: vzorek nahrazen rozpouštědlem (!!! Ředící řada!!!)

Blank: není testovací kultura

6





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. (Duka 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.

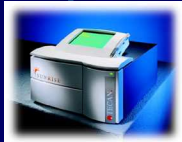
GIT – růstově inhibiční test (EN ISO 10712, ČSN 75 7730)

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>) (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.
Teplotní	Určuje 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.

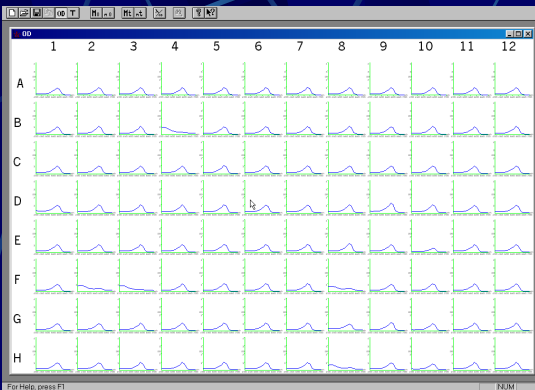
10

Miniaturizace testů



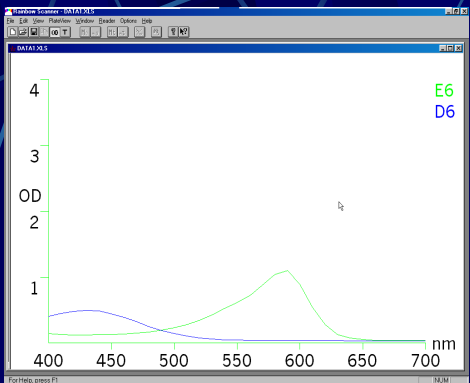
11

Miniaturizace testů



12

Miniaturizace testů



13

Miniaturizace testů

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

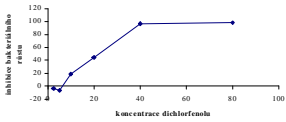
User comment:
Measurement mode: Absorbance
Measurement filter: 610

Měřené hodnoty v
uživatelském rozhraní EXCEL

Raw data

A	0,0670	0,0650	0,0650	0,0670	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	0,0530	0,1680	0,1670	0,1700	0,1500	0,1260	0,0660	0,0620	0,0710	0,0800	0,0600
D	0,0620	0,0560	0,1570	0,1910	0,1680	0,1530	0,1240	0,0670	0,0680	0,0830	0,0760	0,0570
E	0,0620	0,0570	0,2100	0,0880	0,0850	0,0660	0,0740	0,0720	0,0650	0,0780	0,0680	0,0550
F	0,0730	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	0,0740	0,0680	0,0670	0,0740	0,0790	0,0610
H	0,0740	0,0750	0,0780	0,0640	0,0780	0,0620	0,0670	0,0730	0,0730	0,0690	0,0690	0,0610

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

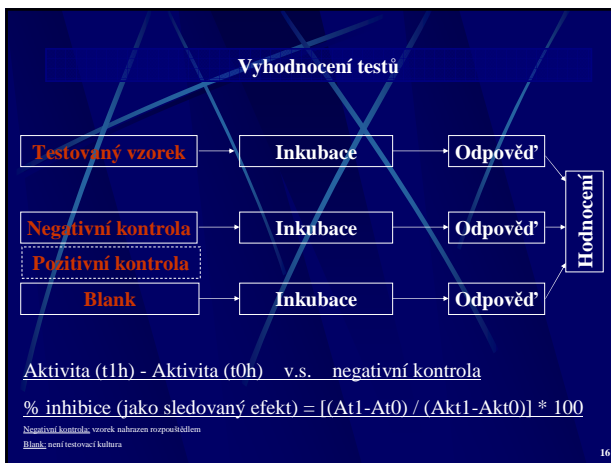


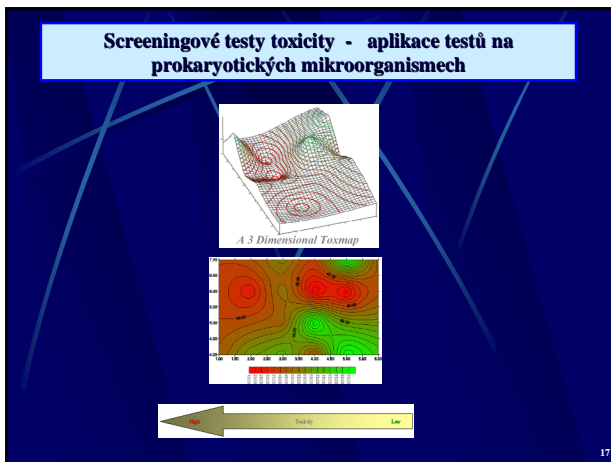
14

Postup



5





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

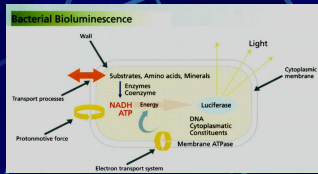
MICROTOX

Microtox	
Organismus	<i>Vibrio fischeri</i> (G-)
Princip	Jsou to testy na mořské luminiscentní bakterii <i>Vibrio fischeri</i> (ISO 11348 1998). Po proběhlé expozici 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 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 ₂ .
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. Přítomná 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 luminiscentních 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 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 aktivity S9. Použití +S9 je popsáno v práci Johnson 1992, aplikace bez-S9 v článku Kwan et al. 1990.
Reakční směs (V)	300 ul.
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. (Willensen et al. 1995). Byla porovnána vysoká 93 % shoda s Ames testem (Legault et al. 1994). Mutatox byl schopen s 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.
Aspirička práce	Áno.
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, vysocce 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 jakéhokoli důvodu 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 luminescence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořčičnatých iontů. Tento systém může být využit pro měření jakéhokoli 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 testovacího vzorku. Znamky se inkubují na rotační třepičce 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. 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 inhibiči luciferázové aktivity, by mělo být zopakováno s podrobnějším ředěním.

23

ATP – TOX system

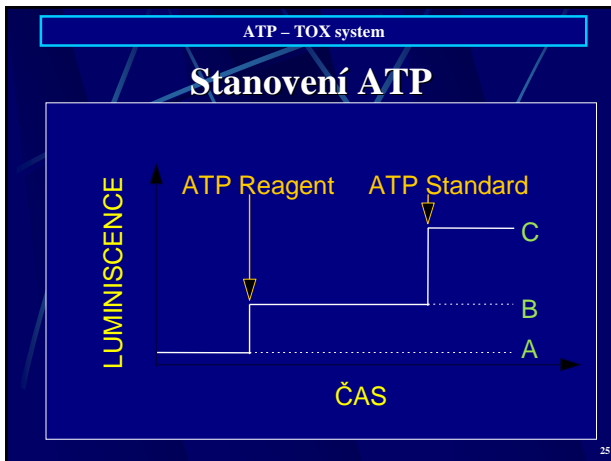
Extrakce ATP

= „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



ATP – TOX system

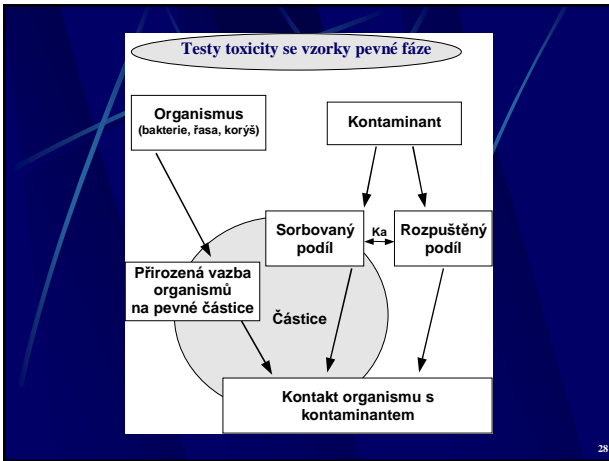
ATP-TOX systém	
Organismus	Libovolná kultura.
Princip	ATP-TOX systém využívá měření aktivity buněčné ATP jako indikátoru růstové inhibice. Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminescence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořečnaných ionů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo kvasy, 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 (činnidlem – TCA, trichloroacetic acid, sono – ultrazvuk). Tím dojde k uvolnění ATP do roztoku, ze kterého se odebrá 800 ul vzorku do reakční směsi.
Trvání testu	
Teplota	Závisí na vybrané kultuře.
Třepání	Doporučené.
Pozitivní kontrola	Chemické látky musí být vybrány s ohledem na možnou inaktivaci enzymu (viz princip).
Aseptická práce	Ano

ATP – TOX system

Automatický BIOSENZOR

Swab Twist Count

Results in 30 Seconds!



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 resazurin (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 μm). Zredukovaný resazurin mění barvu, je tudíž možné míru jeho přeměny spektrofotometricky kvantifikovat.

Přesně definovaná koncentrace

Inokulum

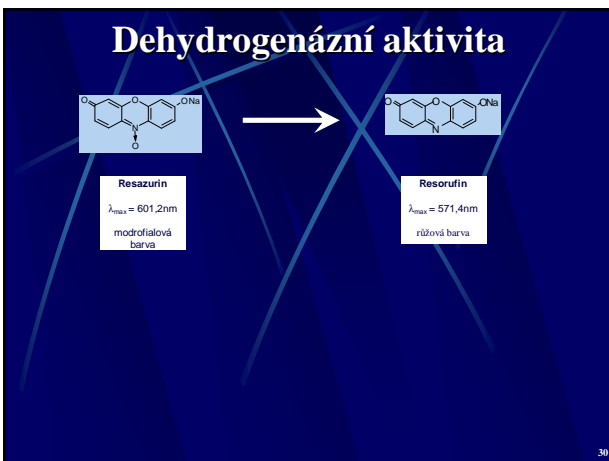
PP

Fosf. pufr + živiny

Navážka sedimentu

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

29



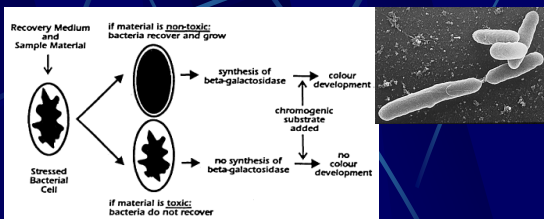
Test na aktivitu dehydrogenáz

Test na aktivitu dehydrogenáz:

Organismus	<i>Bacillus cereus</i> , G+, (CCM 2010).
Princip	Jedná se o test, ve kterém je aplikována sibiřská kulturní bakterie <i>Bacillus cereus</i> přímo do vzorku pevného skupenství a její poškození se sleduje pomocí spektrofotometrického měření změny v množství specifického substrátu resorufinu (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™

Toxi-Chromotest, Toxi-ChromoPad	
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> , mutanta citlivému především k pesticidům, mykotoxinům a těžkým kovům (Kilroy et Gray 1995). Toxi-Chromotest je mikrodestičkový test, který slouží k testování kapalných vzorků a roztoků chemických látek. Při ToxiChromoPad variantě test probíhá ve zkumavkách. Vzorky se pak aplikují na filtrační papíry se substrátovou impregnací (testi pro sedimenty, půdy). Lyofilizované bakterie jsou očkovány 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 Toxi-Chromotestu namátnuta 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 ToxiChromoPadu jsou výsledky hodnoceny jen srovnáním vytvořené kontrolní barvy na filtračním papíře s variantou vzorku (EBPI, 1995).
Citlivost	Kvan et Danka 1990 srovnávali tyto testy s Microtox® testem. Především u vzorků sedimentů jsou tyto testy méně citlivé, než Microtox. Naopak u mykotoxinů a pesticidů byl ToxiChromotest citlivější (Kilroy et Gray 1995).
Reakční směs (V)	U Toxi-ChromoPadu je reakční směs 500 μ l, u klasické mikrodestičkové verze Toxi-chromotestu 250 μ l.
Předkultivace	Dostatečná doba reusitace 10 minut.
Aseptická práce	Aseptická práce je nutná při jakémkoliv manipulaci se vzáložní kulturou.
Trvání testu	2 hodiny.
Teplota	37 °C

34

Toxichromo-Pad®

Ukázka KITU na stanovení toxicity v pevné matici



Toxichromo-test®

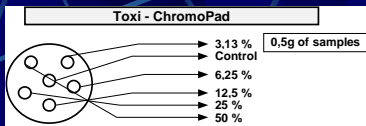
Ukázka KITU na stanovení toxicity v kapalně matici



<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,
- FluoroMe late - fluorogenní substrát (nejcitlivější z celé skupiny,

37

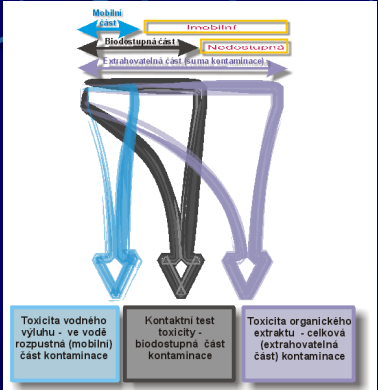
MetPlate

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

38

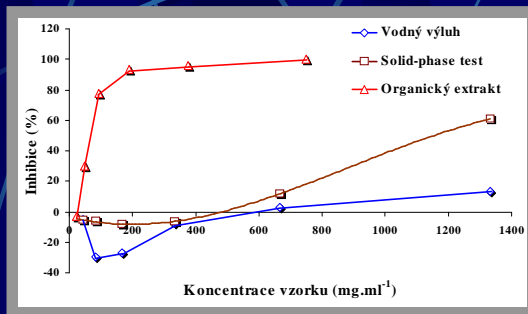
Testy vzorků pevné fáze

TREND:



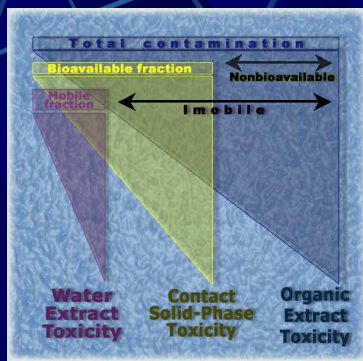
39

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)
- KOMBINOVANÉ

43

MARA

- MARA (Microbial Assay for Risk Assessment)
- The MARA product is a multi-species toxicity test based on an array of 11 micro-organisms that
 - is simple to use
 - provides a 'battery of tests' within a test
 - produces data for 11 test results
 - can be used to produce toxic fingerprints of chemicals or environmental samples
 - requires small sample volumes

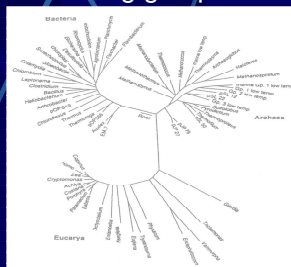


44

MARA

The MARA test includes genetically diverse organisms from the following groups:

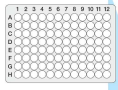
- Prokaryotes
 - Gram +ve
 - Gram -ve
- Eukaryote
 - yeast



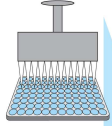
45

TEST TOXICITY: experimentální design

Assay Procedure

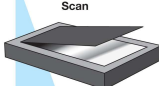


Preparation
Lyophilised Organisms
Reconstitution
30°C
4h



Assay
Substrate
Medium + Dye
Sample
Dilution series
Inoculation

Incubation
30°C
18h

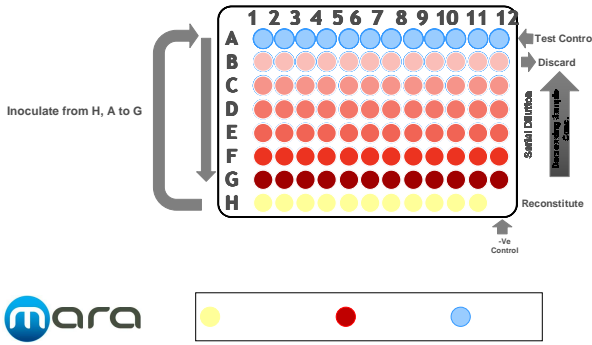


Scan

Data Analysis
Dedicated Software

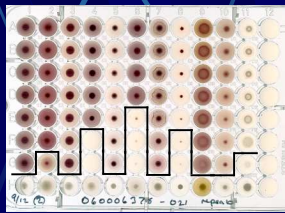
46

Protocol



Microbial Fingerprint (effluent)

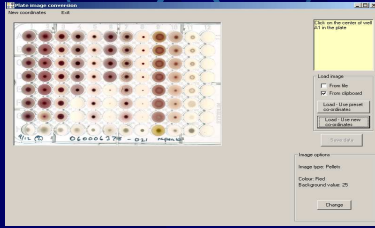
A microbial fingerprint can be derived from the analysis



48

MARA Software – Image Screen

The plate image is copied into the image analysis software



49

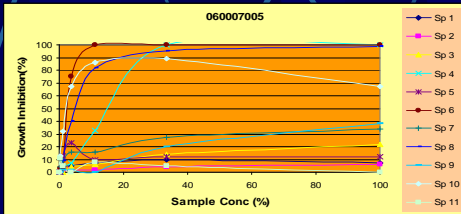
MARA Software – Data Screen



50

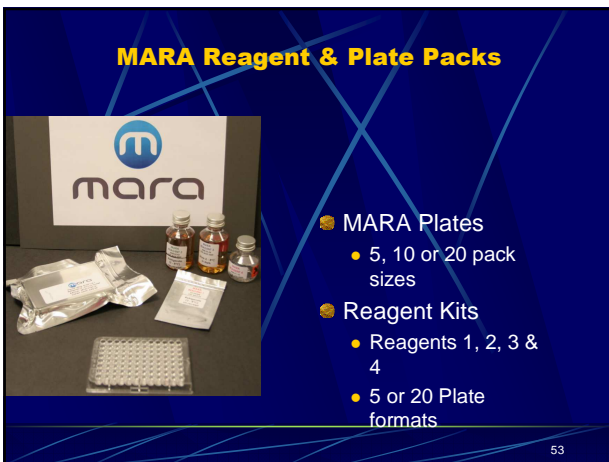
Species Response

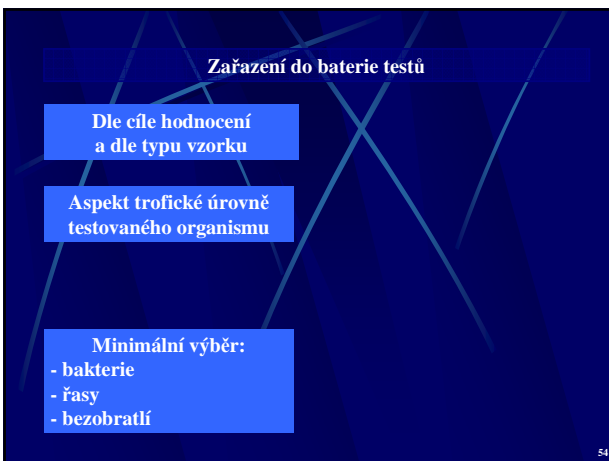
When the data generated by the software is plotted, each of the species shows a different response to the toxicant.

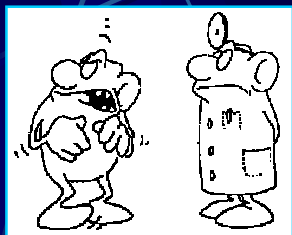


51









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

55
