
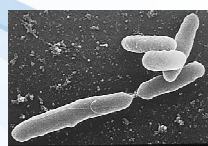



**Ekotoxikologické biotesty**  
**Testy ekotoxicity s destruenty**

**2013**






<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2013/Bi5620/index.qwarp>

Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

Pavel Čupr  
[cupr@recetox.muni.cz](mailto:cupr@recetox.muni.cz)

Vizitka QR

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

### 20.3. Mikroorganismy - prezentace

ČSN EN ISO 11348-3

Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri*  
(Zkouška na luminiscenčních bakteriích)

Albrechtová

## Procaryotes

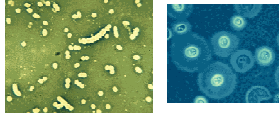
- ◆ DNA is not in a membrane; is a circular chromosome.
- ◆ Lack other membrane-enclosed organelles.
- ◆ DNA is not associated with histone proteins.
- ◆ Cell walls contain peptidoglycan.

### Shapes of Procaryotes

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

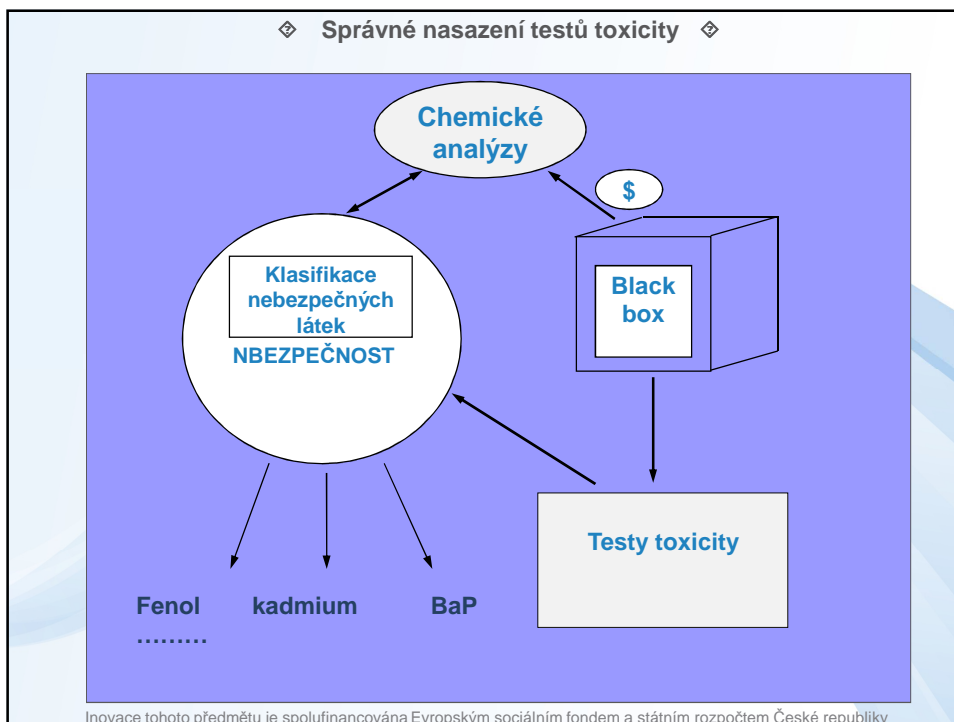
### Special stains

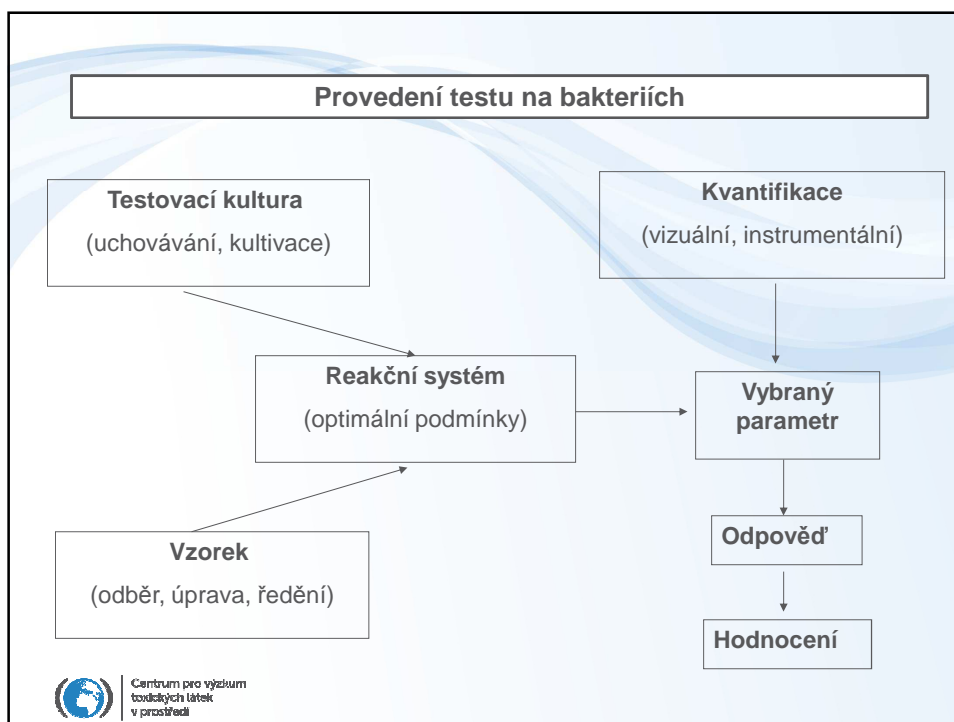
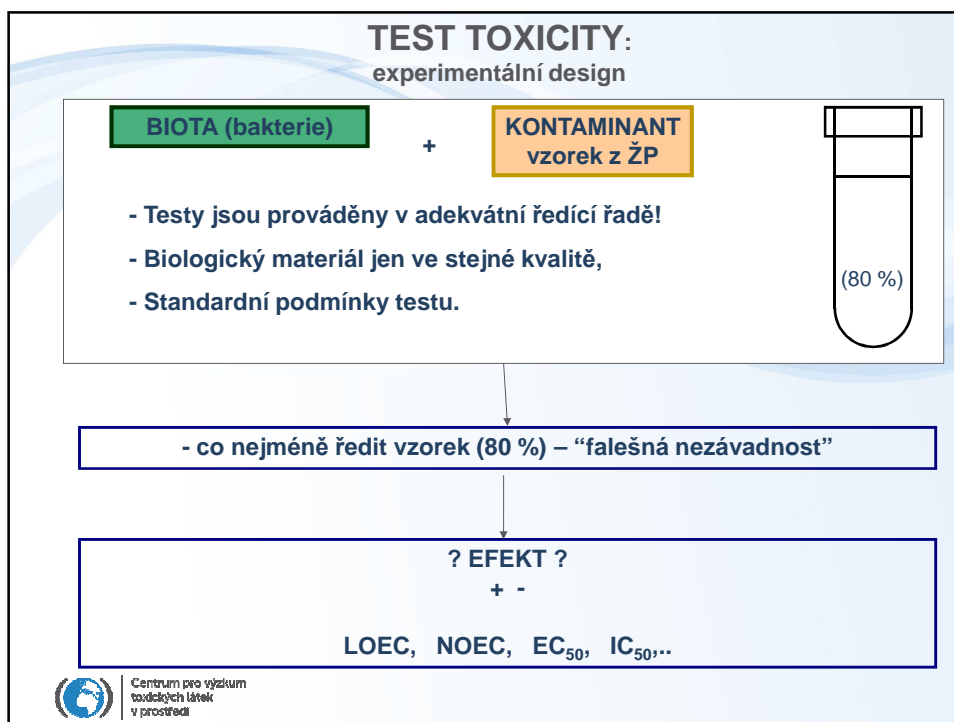
◆ Capsule stain

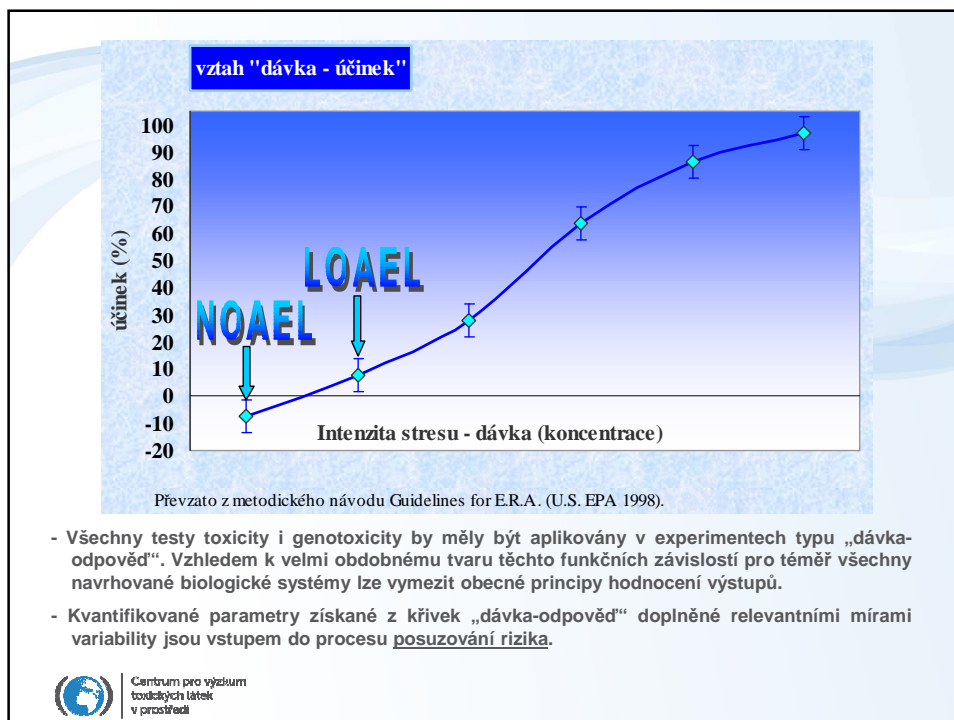
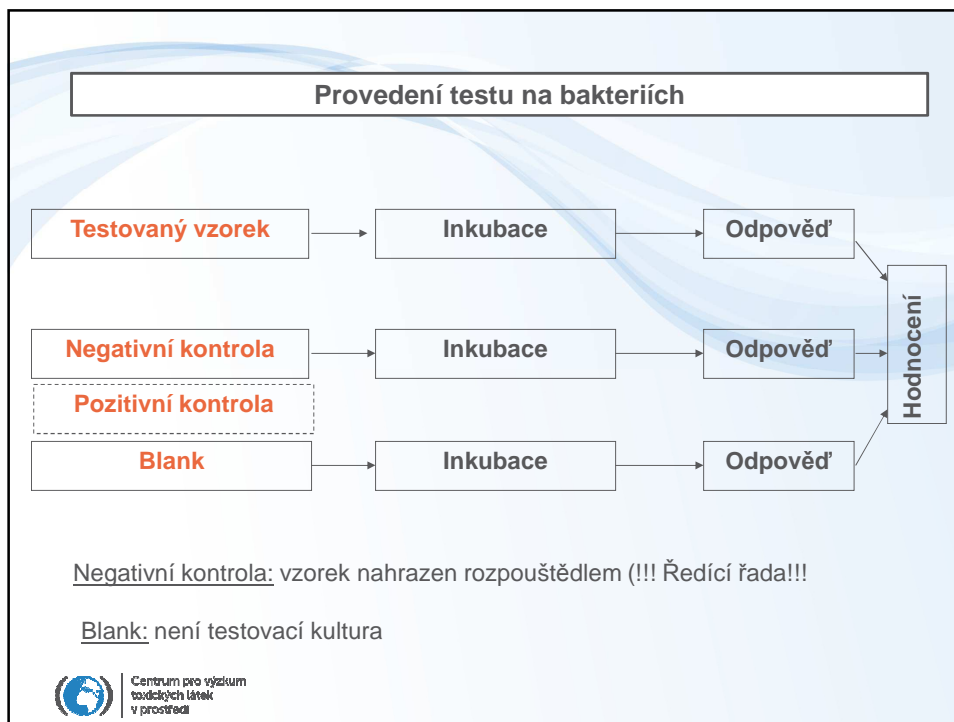


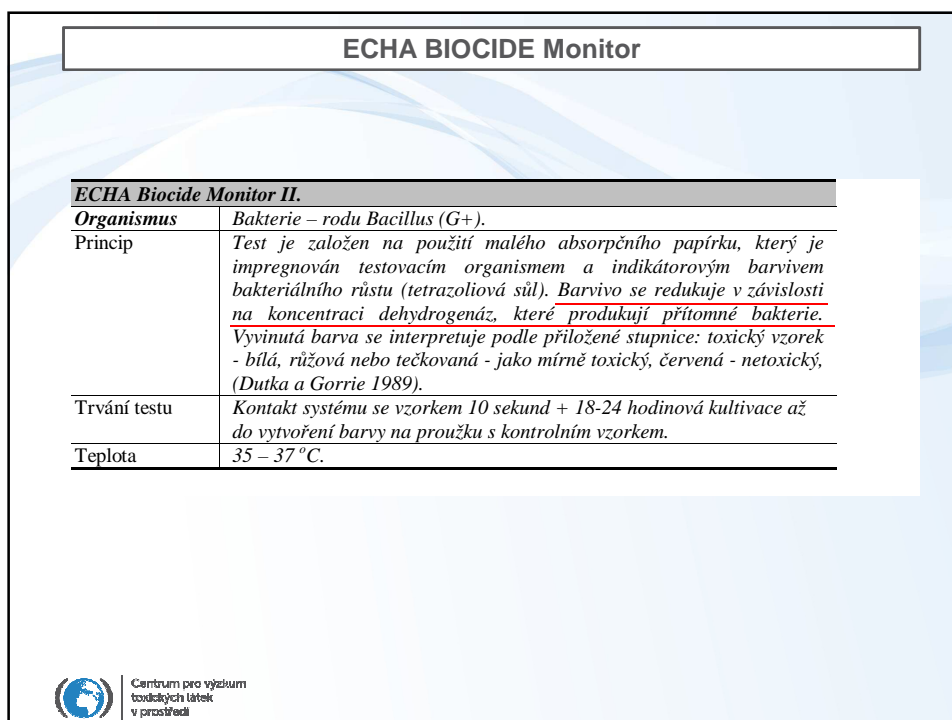
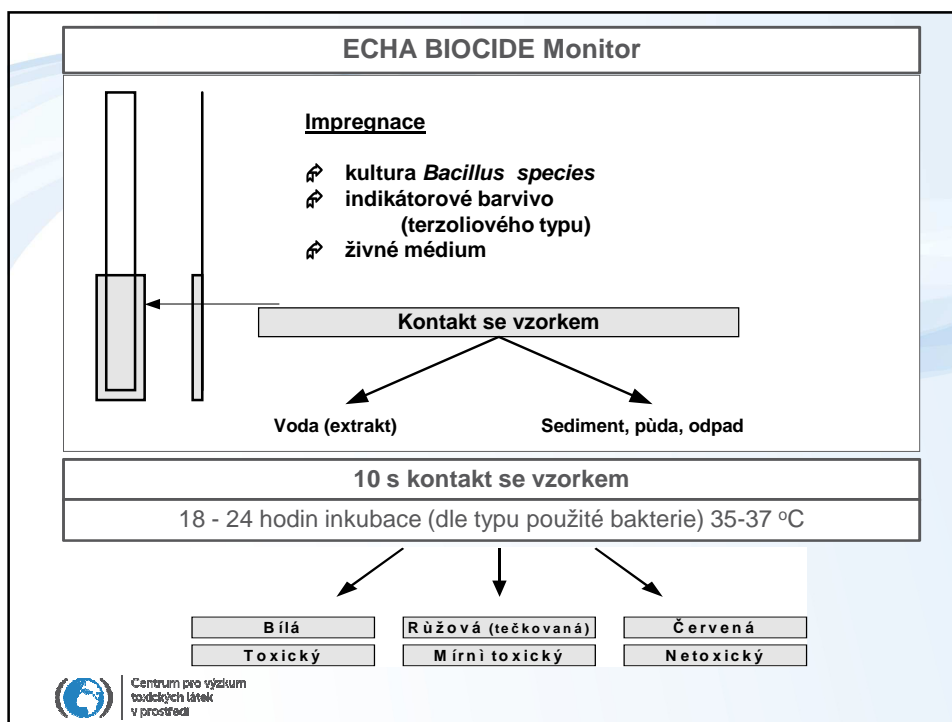
### Procaryotes

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









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

#### Turbidimetrický test – EN ISO 10712, ČSN 75 7730

<b>Organismus</b>	<i>Pseudomonas putida</i> (případně <i>fluorescens</i> ) G-.
<b>Princip</b>	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 $\lambda$ je 650 nm, která je optimální pro <i>Pseudomonas fluorescens</i> ) (Dočkal et Soldán, 1988).
<b>Reakční směs (V)</b>	100 ml dle ČSN, případně nižší.
<b>Předkultivace</b>	18 hodin.
<b>Trvání testu</b>	16 ± 1 hodin (6).
<b>Teplota</b>	23 ± 1 °C.
<b>Třepání</b>	Urychluje průběh testu (není podmínkou).
<b>Pozitivní kontrola</b>	3, 5 – dichlorfenol.
<b>Aseptická práce</b>	Velmi limitující pouze při zakládání testu a při uchovávání kultury.
<b>Doporučení</b>	Finančně velmi výhodný test. Vhodný k testování odpadů – toxických vzorků bez vysokého zákalu a zbarvení.

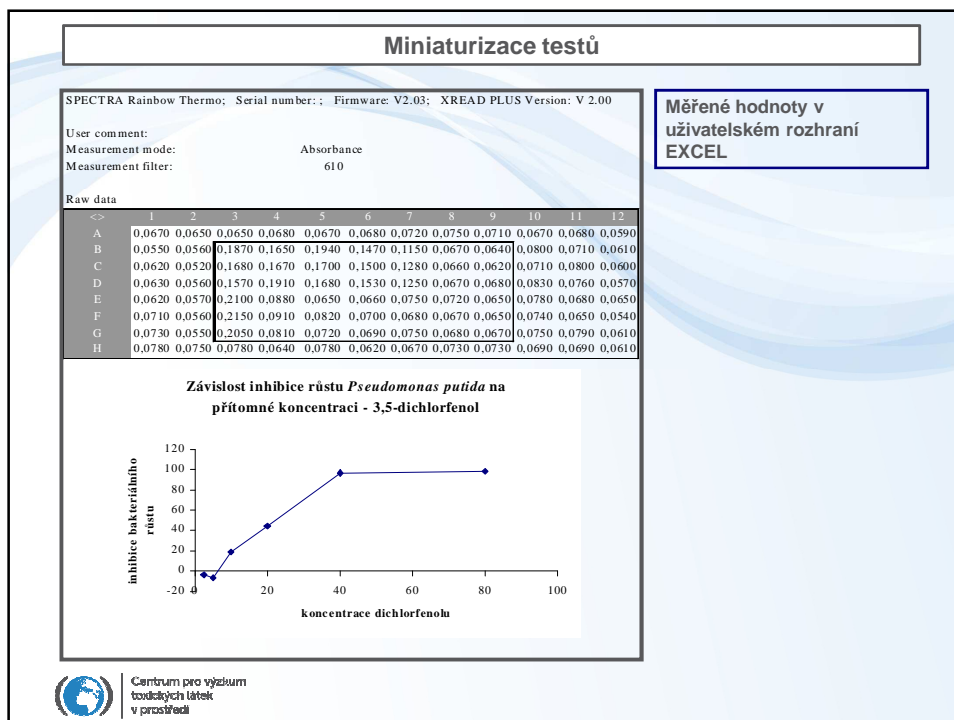
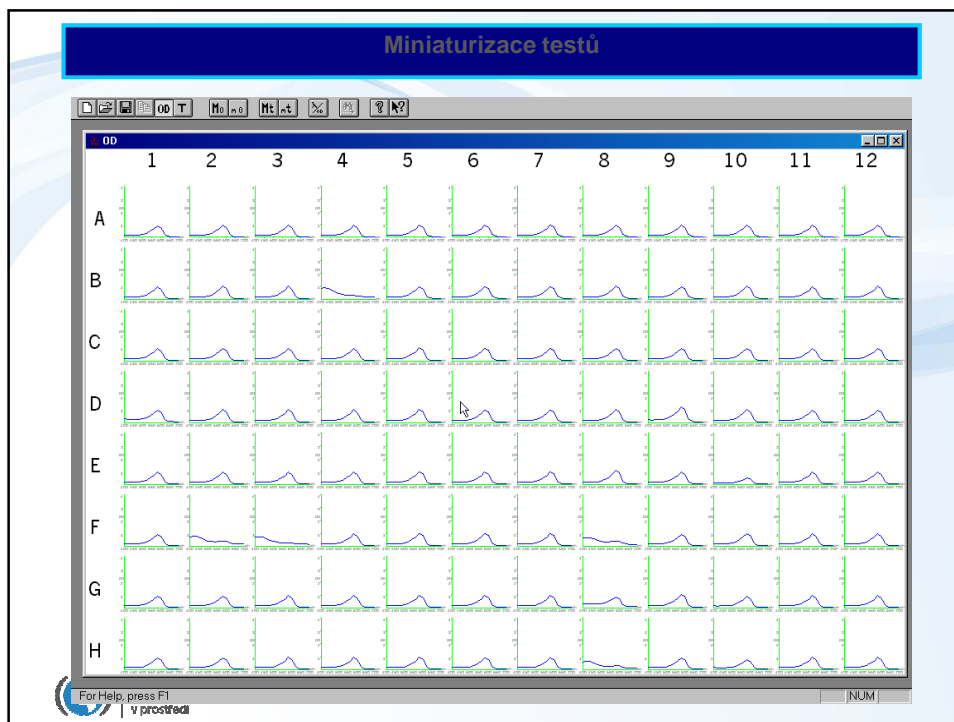


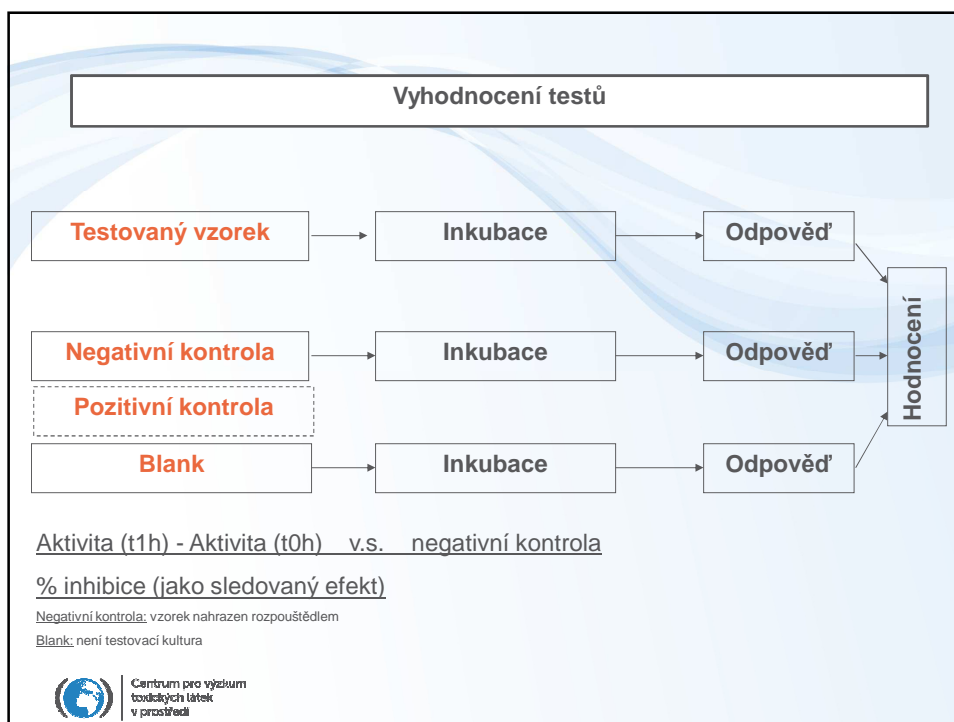
Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

### Miniaturizace testů



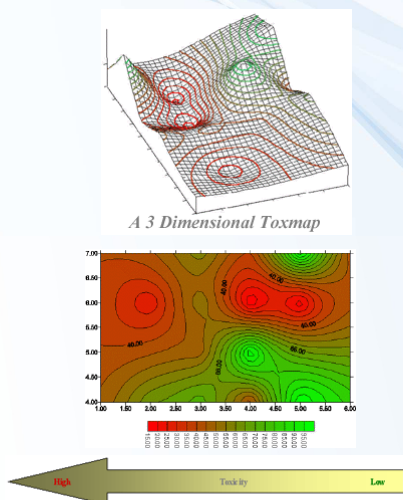
Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí







### Screeningové testy toxicity - aplikace testů na prokaryotických mikroorganismech

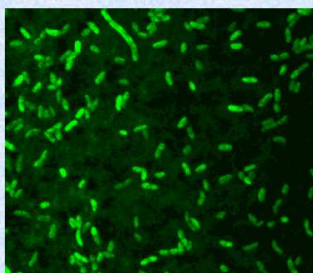


Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

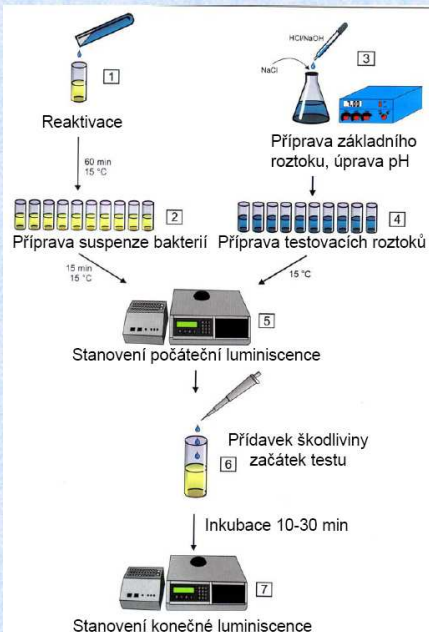
### MICROTOX

#### MICROTOX - Akutní test toxicity (BioFix® Lumi)

Salinní bakterie *Vibrio fischeri*  
vykazující bioluminiscenci



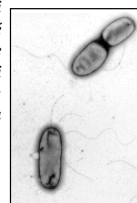
- redukce intenzity bioluminiscence vlivem působení škodliviny
- vzorky: chemikálie, jejich směsi, odpadní vody, extrakty sedimentů a půd
- dobře reprodukovatelný



## MICROTOX

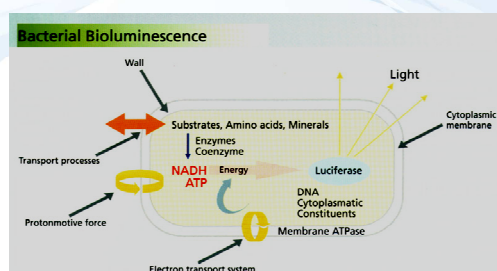
**Microtox**

<b>Organismus</b>	<i>Vibrio fischeri</i> (G-)
<b>Princip</b>	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 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".
<b>Reakční směs (V)</b>	1 ml. Poměr vzorek:inokulum je 500:500 µl, případně i 800:200 µl.
<b>Předkultivace</b>	10 – 15 minutová resuscitace lyofilizované bakterie (15 °C).
<b>Trvání testu</b>	5, 10, 15, 20, 30 minut. Sleduje se jen jeden endpoint, nebo kinetická odpověď bakterie v několika zvolených intervalech.
<b>Teplota</b>	15 °C.
<b>pH</b>	Optimum 6 – 8,5 pH.
<b>Třepání</b>	Ne.
<b>Pozitivní kontrola</b>	ZnSO <sub>4</sub> .
<b>Aseptická práce</b>	Není nutná.



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## 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.



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## 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



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Mutatox

<b>Mutatox</b>	
<b>Organismus</b>	Využívání bakterie <i>Vibrio fischeri</i> - „dark mutant“ - za normálních podmínek neluminuje (G-).
<b>Princip</b>	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.
<b>Reakční směs (V)</b>	500 µl.
<b>Předkultivace</b>	30 minut v 37 °C vodní lázni.
<b>Trvání testu</b>	16 – 24 h.
<b>Citlivost</b>	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%).
<b>Teplota</b>	23 ± 1 °C.
<b>Třepání</b>	Ne.
<b>Pozitivní kontrola</b>	2-AA, 2-AF, BaP..
<b>Aseptická práce</b>	Ano.
<b>Doporučení</b>	Test je doporučen provádět v kombinaci s Microtox testem, který mu musí předcházet (Hauser et al. 1997).



### 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 hořčičných iontů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo řasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách:

#### luciferáza

- luciferin + ATP + O<sub>2</sub> -----> oxyluciferin + AMP + PPi + CO<sub>2</sub> + světlo (~562 nm)

#### Mg<sup>2+</sup>

- 18-24 hodinová buněčná kultura se naředí na potřebnou hustotu a přidá se k jednotlivým koncentracím testovaného vzorku. 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. 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.



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

### ATP – TOX system

## Extrakce ATP

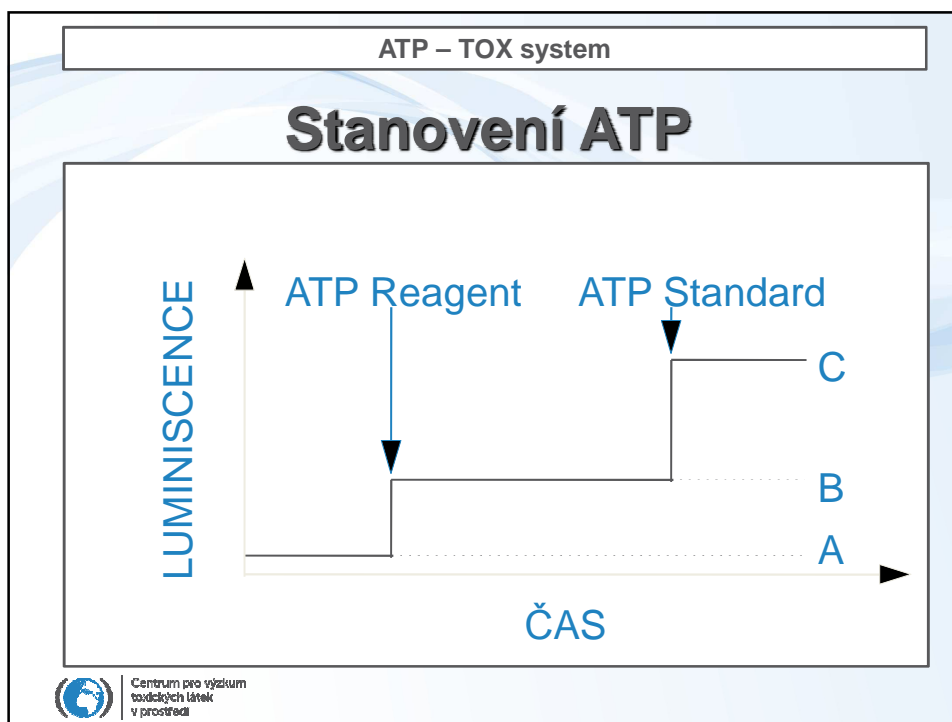
= „rozbití“ buněčné stěny a uvolnění buněčného obsahu včetně ATP

**extrakční činidla:** TCA, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, detergent - benzethonium chlorid, DMSO...

možná inhibice luciferázy extrakčním činidlem ---> nutné ředění (TCA) nebo neutralizace (benzethonium chlorid, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí




ATP – TOX system

ATP-TOX systém	
<b>Organismus</b>	Libovolná kultura.
<b>Princip</b>	ATP-TOX system využívá měření aktivity buněčné ATP jako indikátoru růstové inhibice. Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminiscence, 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 (Dutka 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..
<b>Reakční směs (V)</b>	1 ml. (200 ul roztoku enzymu + 800 ul vzorku)
<b>Předkultivace</b>	Závisí na typu kultivovaných buněk (18-24)
<b>Trvání testu</b>	Po proběhlé expozici se provede rozrušení stěn buněk (činidlem – TCA, trichloroctová kyselina, sono – ultrazvuk). Tím dojde k uvolnění ATP do roztoku, ze kterého se odebrá 800 ul vzorku do reakční směsi.
<b>Teplota</b>	Závislá na vybrané kultuře.
<b>Třepání</b>	Doporučené.
<b>Pozitivní kontrola</b>	Chemické látky musí být vybrány s ohledem na možnou inaktivaci enzymu (viz princip).
<b>Aseptická práce</b>	Ano


Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

**ATP – TOX system**


**Automatický BIOSENZOR**



**Swab**

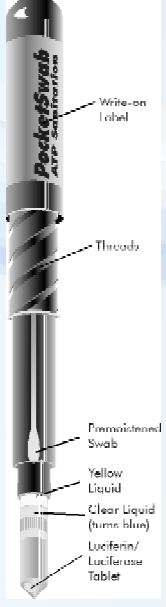


**Twist**

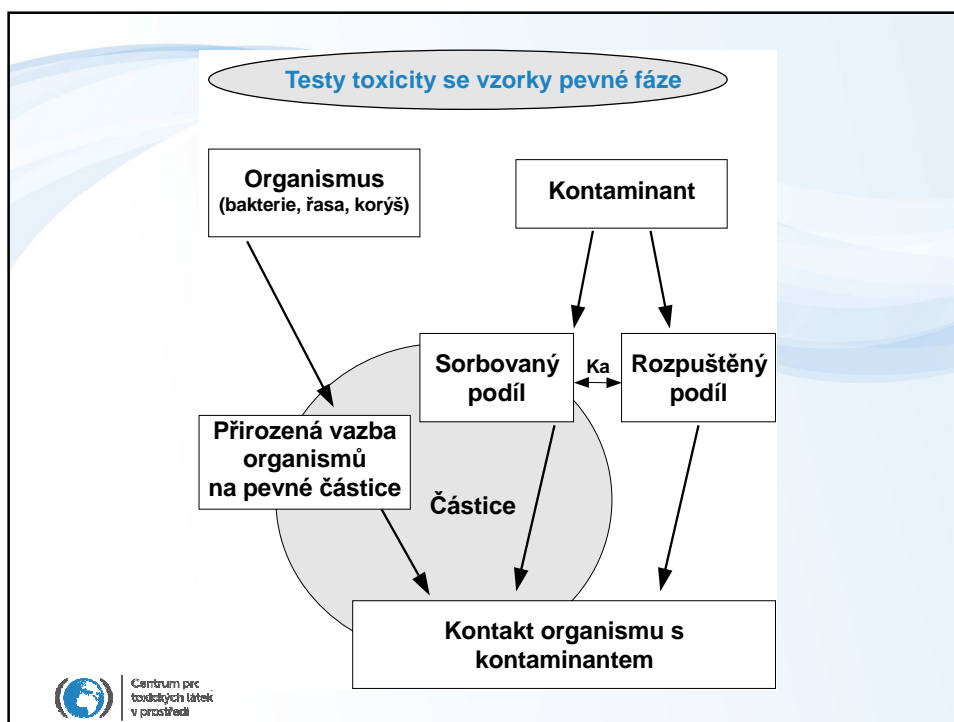


**Count**

**Results in 30 Seconds!**



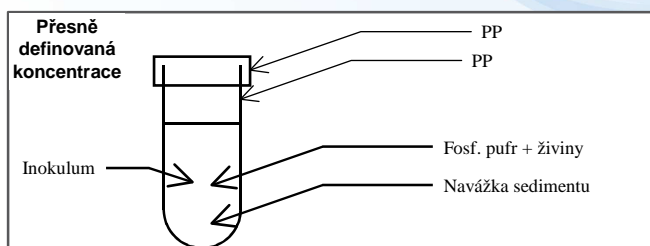
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí



### 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 mm). Zredukovaný resazurin mění barvu, je tudíž možné míru jeho přeměny spektrofotometricky kvantifikovat.

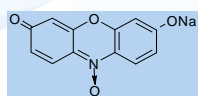


inkubace (2h, 70 rpm, 25 °C)  
+ resazurin



Centrum pro výzkum  
toxikologických látek  
v prostředí

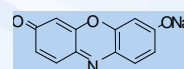
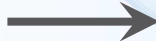
### Dehydrogenázní aktivita



Resazurin

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

modrofialová  
barva



Resorufin

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

růžová barva



Centrum pro výzkum  
toxikologických látek  
v prostředí

### Test na aktivitu dehydrogenáz

#### Test na aktivitu dehydrogenáz

<b>Organismus</b>	<i>Bacillus cereus</i> , G+, (CCM 2010).
<b>Princip</b>	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).
<b>Reakční směs (V)</b>	6 ml.
<b>Předkultivace</b>	18 hodin při kontinuálním třepání (220 rpm) při teplotě 21 °C, ( $OD_{601}=0,4$ ).
<b>Trvání testu</b>	4 hodiny.
<b>Teplota</b>	21 °C.
<b>Třepání</b>	Kontinuální třepání 70 rpm.
<b>Aseptická práce</b>	Pouze při práci se zásobní kulturou.
<b>Výhody</b>	Bezextrakční test matrice pevného skupenství. Tato metoda testuje účinky i těch kontaminantů, které jsou vázané na povrch pevných částíček půd a sedimentů. Výhodou je jeho metodická „benevolentnost“ k přítomnosti kyslíku a dobrá rozpustnost resorufinu ve vodě a tím jeho jednoduchá extrahovatelnost.



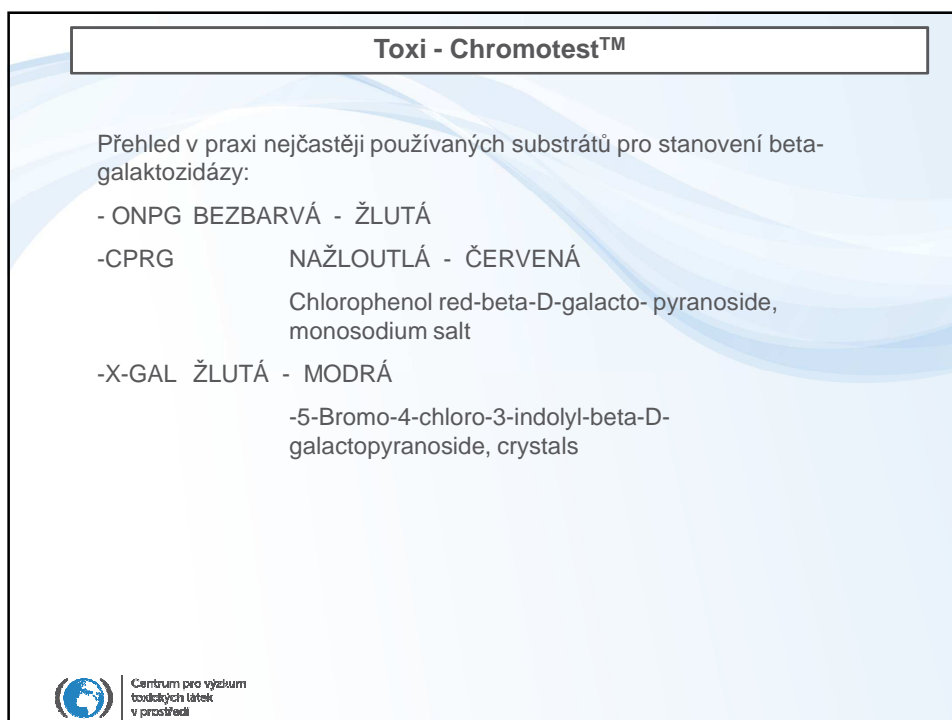
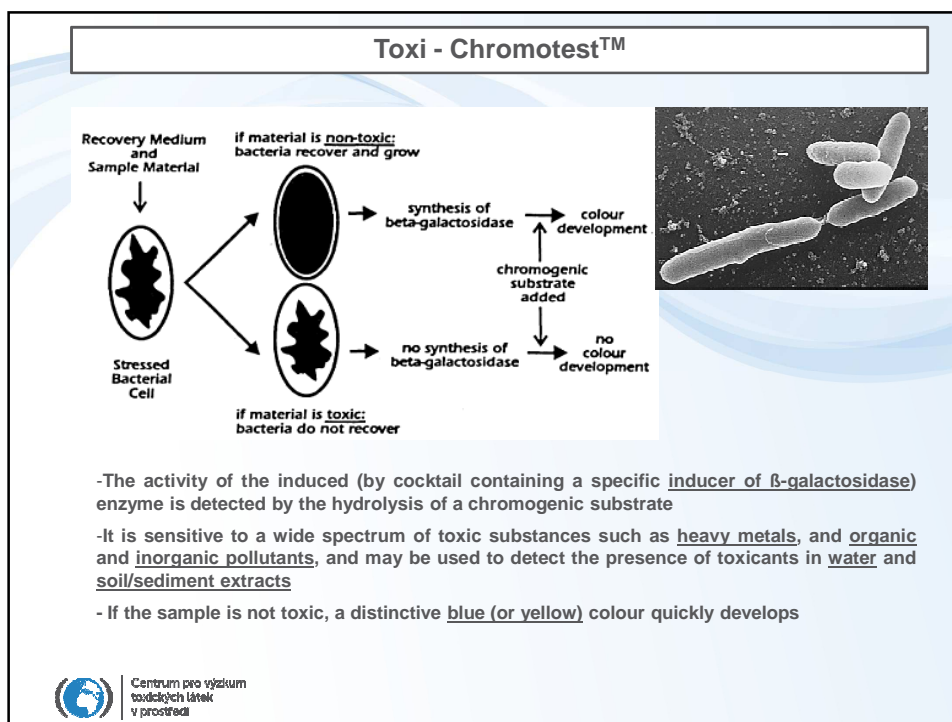
Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

### Toxi - Chromotest™

#### Toxi-Chromotest, Toxi-ChromoPad

<b>Organismus</b>	<i>Escherichia coli</i> , gramnegativní (G-), K12 OR85.
<b>Princip</b>	Princip obou testů je založen na schopnosti toxinů inhibovat <i>de novo</i> syntézu $\beta$ -galaktozidázy v kmeni <i>Escherichia coli</i> , mutantu 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 (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 $\beta$ -galaktozidázy. Směs je u Toxi-Chromotestu 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 ToxiChromoPadu jsou výsledky hodnoceny jen srovnáním vytvořené kontrolní barvy na filtračním papíře s variantou vzorku (EBPI, 1995), (Kwan 1993, Kwan 1995, Rao et al., 1991).
<b>Citlivost</b>	Kwan et Dutka 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).
<b>Reakční směs (V)</b>	U Toxi-ChromoPadu je reakční směs 500 $\mu$ l, u klasické mikrodestičkové verze Toxi-chromotestu 250 $\mu$ l.
<b>Předkultivace</b>	Dostatečná doba resuscitace 10 minut.
<b>Aseptická práce</b>	Aseptická práce je nutná při jakékoliv manipulaci se zásobní kulturou.
<b>Trvání testu</b>	2 hodiny.
<b>Teplota</b>	37 °C





### Toxichromo-Pad®

Ukázka KITu na stanovení toxicity v pevné matici



### Toxichromo-test®

Ukázka KITu na stanovení toxicity v kapalně matici





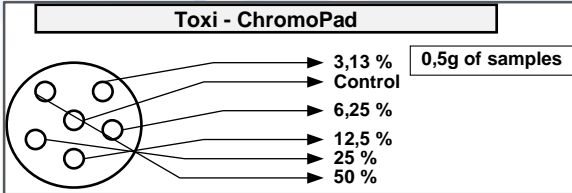
<http://www.ebpi.ca/>

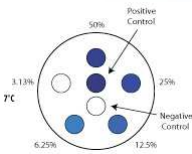



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí


### Toxi - ChromoPad™

**Toxi - ChromoPad**





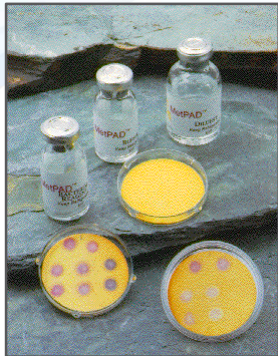





Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

**MetPad, MetPlate, FluoroMetPlate, MetSoil**

**MetPad**




**MetPlate**



Enzymová inhibice syntézy B-galaktosidázy


35°C, 90 min., rehydratace lyofilizované kultury

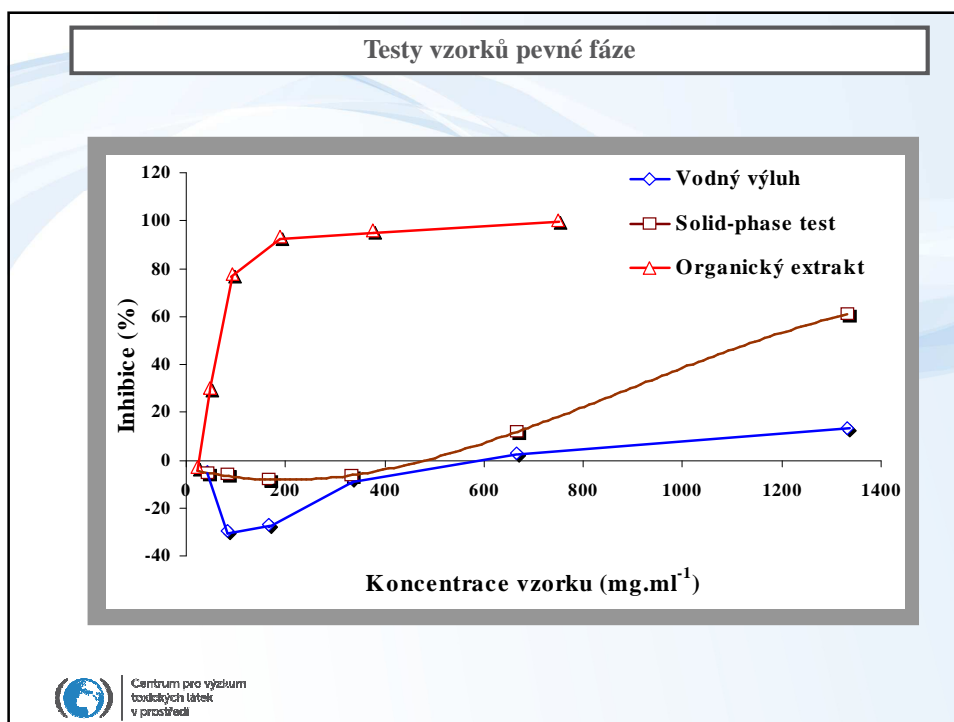
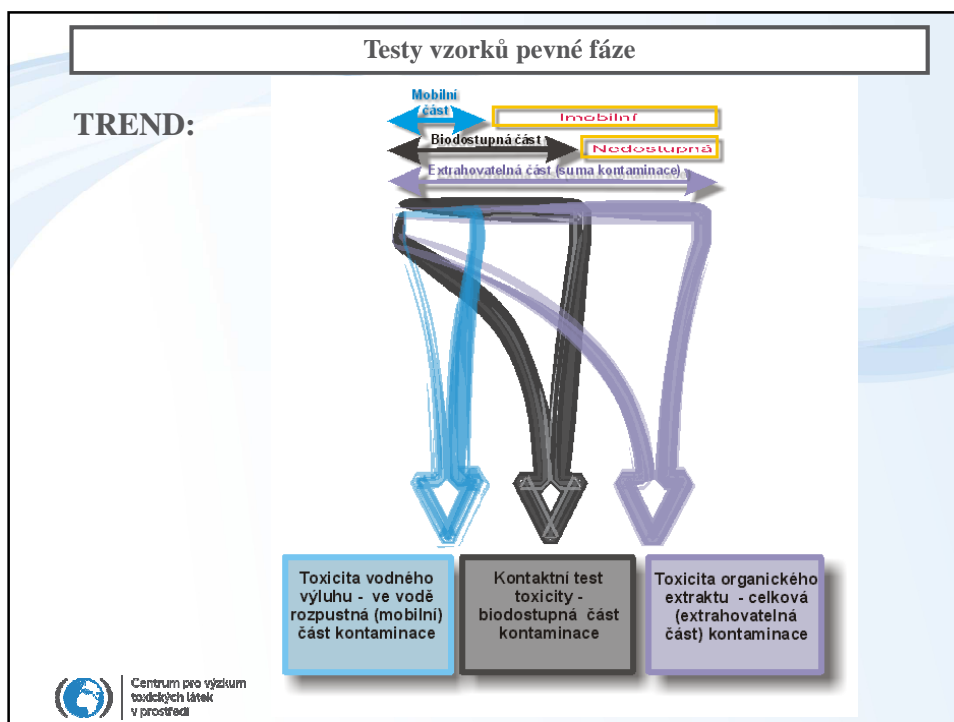
- specifita na těžké kovy X velmi slabá reakce na znečištění organickými polutanty
- test provádět vždy v kombinaci s jiným testem,
- FluoroMetPlate - fluorogenní substrát


 Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

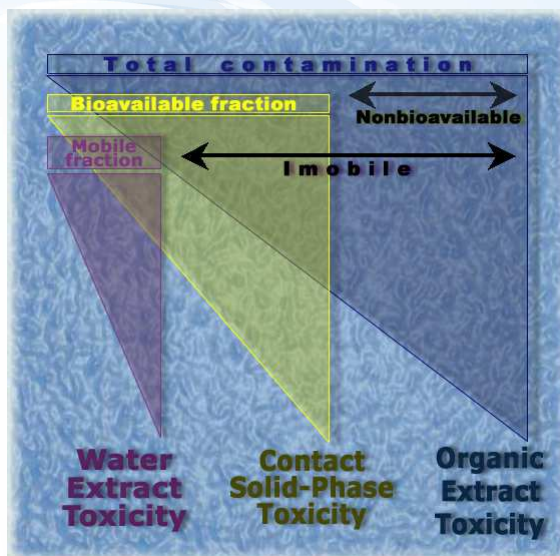
**MetPlate**

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


 Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



### Testy vzorků pevné fáze – DOPORUČENÍ DO BUDOUCNA



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

### 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



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Trendy ve vývoji bakteriálních testů

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



Centrum pro výzkum  
 toxikologických látek  
 v prostředí

## 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



## MARA

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

### Prokaryotes

- Gram +ve
- Gram -ve

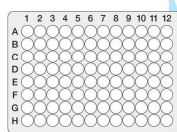
### Eukaryote

- yeast



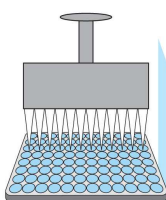
## TEST TOXICITY: experimentální design

### Assay Procedure



#### Preparation

Lyophilised Organisms  
Reconstitution  
30°C  
4h

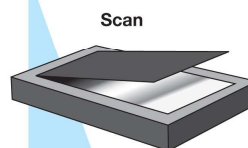


#### Assay

Substrate  
Medium + Dye  
Sample  
Dilution series  
Inoculation

#### Incubation

30°C  
18h



#### Scan

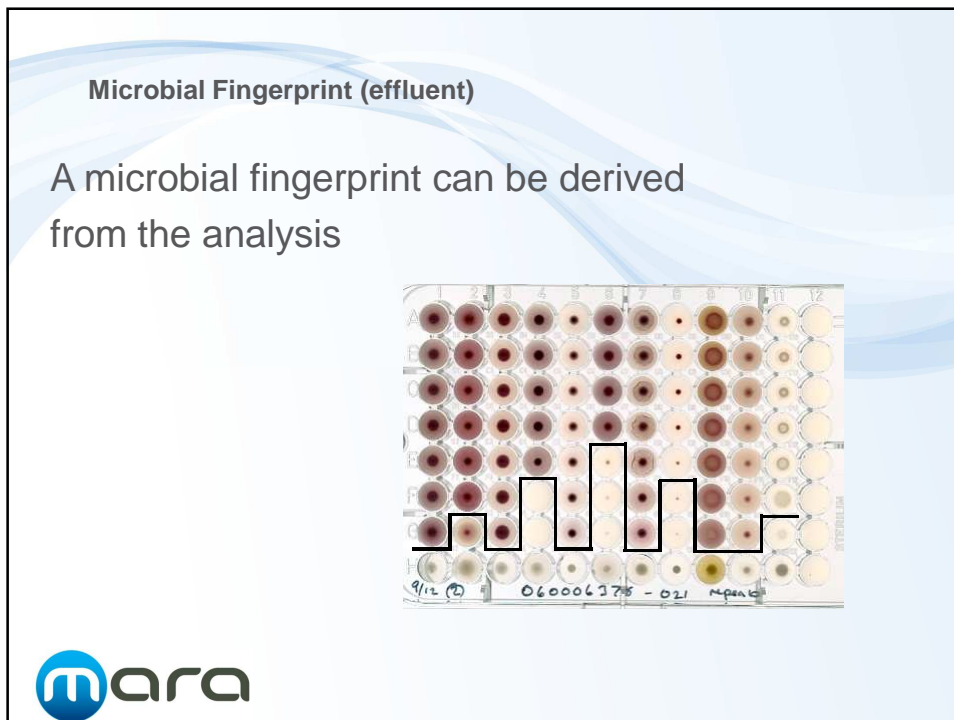
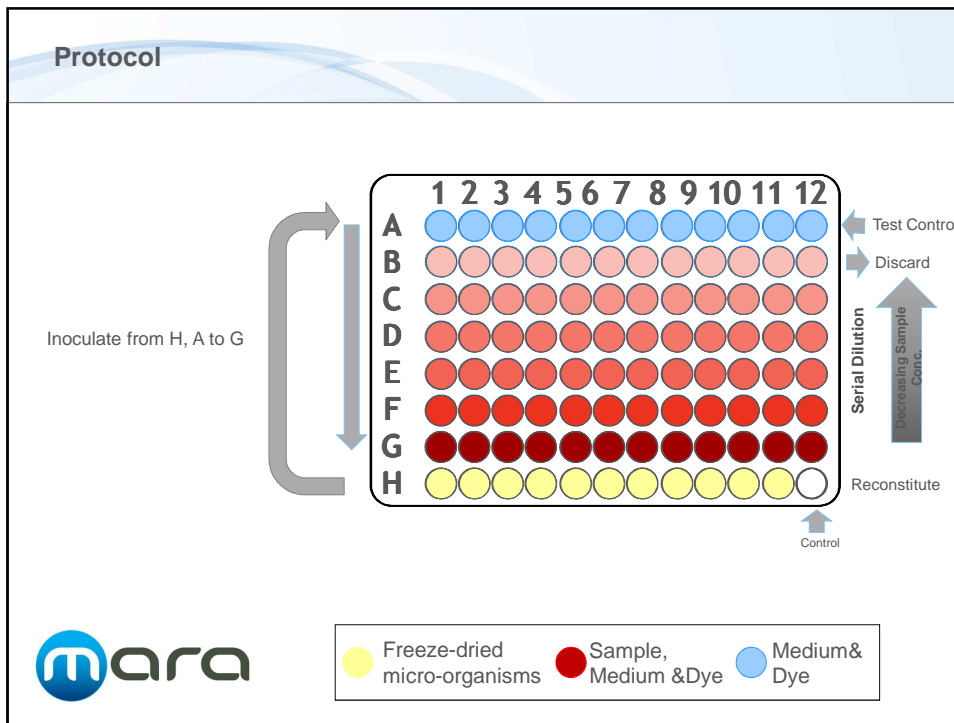
#### Data Analysis

Dedicated Software



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

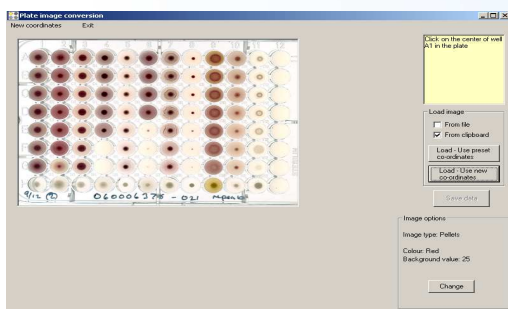






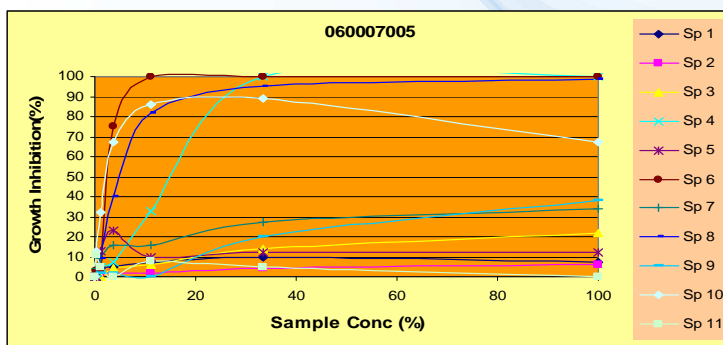
## MARA Software – Image Screen

The plate image is copied into the image analysis software



## Species Response

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



Centrum pro výzkum  
toxicologických látek  
v prostředí

## Mara Starter Pack



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Zařazení do baterie testů

**Dle cíle hodnocení  
a dle typu vzorku**

**Aspekt trofické úrovně  
testovaného organismu**

**Minimální výběr:**

- bakterie
- řasy
- bezobratlí



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Ekotoxikologické biotesty

### Testy genotoxicity 2013

Pavel Čupr  
cupr@recetox.muni.cz




evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost




UNIVERSITAS  
BRUNNENSIS  
MASARYKIANA  
BRUNNENSIS

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

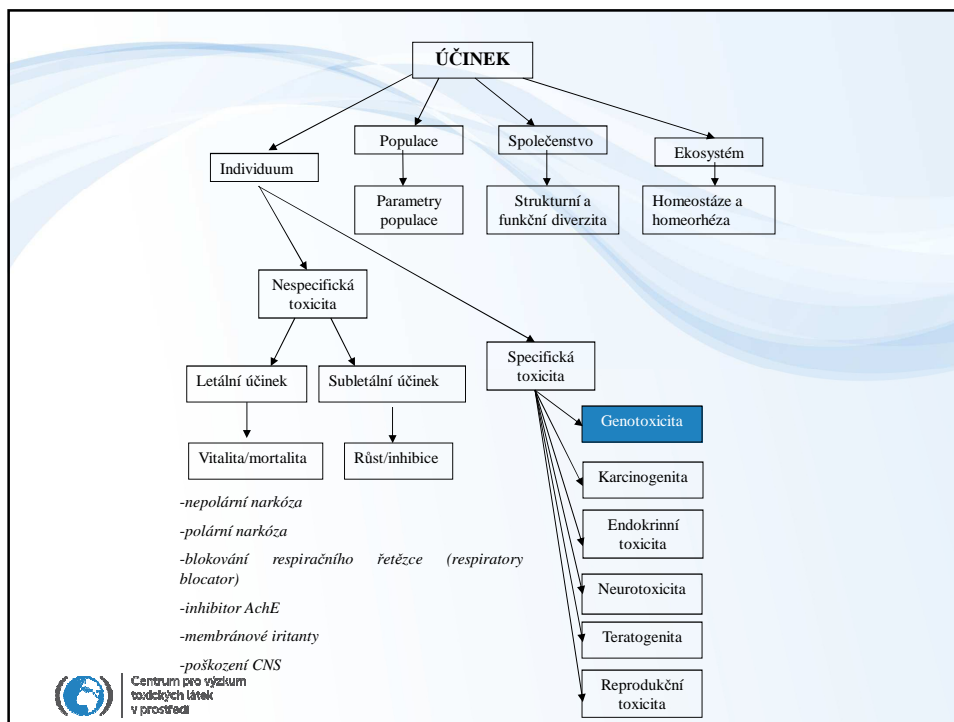
Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

## GENOTOXICITA

- toxická pro genom
- genotoxické faktory jsou schopny interagovat s DNA za vzniku reverzibilních i ireverzibilních změn
- poškození genomu může následně vést k mutagenézi, karcinogenezi, indukci fágů, buněčné smrti, chromozomálním aberacím a dalším neméně závažným důsledkům



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



## MUTACE

- za mutaci je považována jakákoliv změna v genetické informaci buněk, která není výsledkem rekombinace či segregace při dělení buněk, a je přenášena do dalších generací buněk či jedinců.
- proces vzniku mutací je označován jako mutagenese.

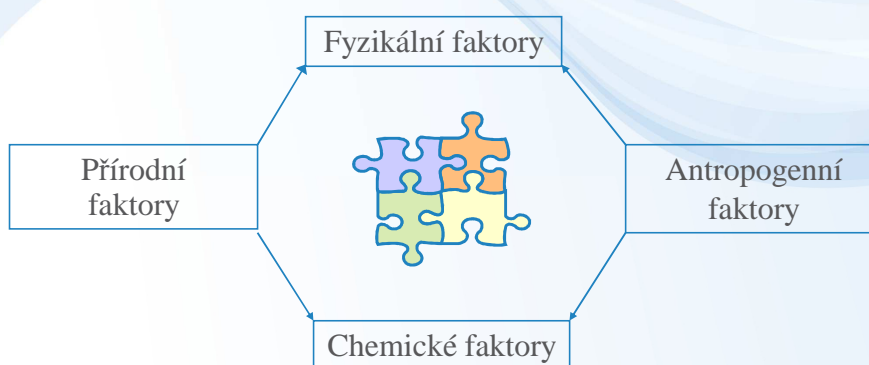
## MUTAGENEZE

- několikafázový proces.
- genotoxická látka s mutagenními účinky po vstupu do organismu a na základě své toxikokinetiky proniká v původní či změněné podobě do buňky (fáze 1).
- následně dochází k interakci s DNA v genomu, jejichž podstatou je kovalentní vazba na molekulu DNA, interkalace mezi řetězce dvojšroubovice, interakce s mitotickými strukturami (fáze 2).
- mutace, tedy změna v genotypu, která není letální, může v určitém časovém horizontu vést k transkripci a realizaci změněné informace, která se následně promítá v podobě mutantního fenotypu (fáze 3).
- procesu mutagenese nemusí být dokončen v případě, že daný genotoxický zásah je pro danou buňku letální či mutace byla včas opravena.



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## GENOTOXICKÉ FAKTORY

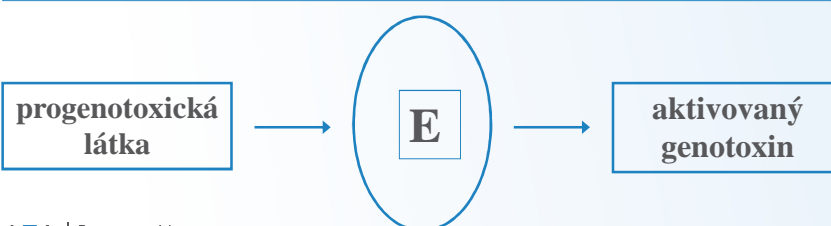


Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## AKTIVACE PROGENOTOXINŮ I.

přímé mutageny – skupina látek, jež vykazuje své genotoxické účinky ve stávajícím stavu díky přítomnosti silně elektrofilní skupiny.

nepřímé mutageny – látky, jež za normálních podmínek nevykazují genotoxické účinky, ale v případě enzymatické přeměny získávají vhodnou molekulární strukturu, která umožňuje účinnou interakci s DNA.

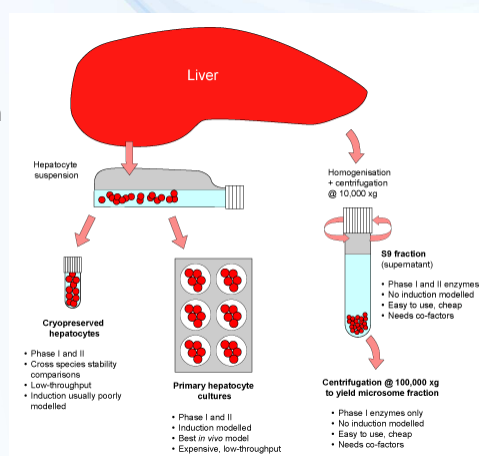


Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## AKTIVACE PROGENOTOXINŮ

Nejčastěji využívaným provedením metabolické aktivace je příprava mikrosomální frakce (S9 frakce):


- žaterní mikrosomální frakce z potkanů či myší
- mikrosomální frakce z plic, ledvin či mozku potkanů a myší
- žaterní mikrosomální frakce lidských jater
- žaterní mikrosomální frakce z ryb
- rostlinná mikrosomální frakce



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## PŘEHLED NEJPOUŽÍVANĚJŠÍCH TESTŮ GENOTOXICITY A MUTAGENITY


### VYHODNOCOVÁNÍ, INTERPRETACE A EXTRAPOLACE VÝSLEDKŮ TESTŮ



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## DETEKČNÍ SYSTÉMY GENOTOXICKÝCH ÚČINKŮ

- Jednoduchost
- Rychlost




Živočichové

Houby


**Detekční  
systémy**

Bakterie

Rostliny



- Interpretace
- Extrapolace



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## PRINCIP BAKTERIÁLNÍCH TESTŮ GENOTOXICITY

Tři principiálně odlišné modely pro detekci genotoxických faktorů:

➤ **model 1: DNA léze vede ke změně smyslu informace**

V důsledku indukce reverzní mutace dochází k obnově určité vlastnosti buněk testovacího kmene, která je následně sledována.

➤ **model 2: DNA léze indukuje SOS odpověď zahrnující SOS mutagenézi**

V důsledku indukce poškození DNA je spuštěn systém SOS odpovědi, která je determinována skupinou SOS genů, jejichž aktivace je následně sledována na základě přepisu vhodného spřaženého reportérového genu (specifický fúzní gen *SOS gen::reportérový gen*).

➤ **model 3: DNA léze vede ke smrti buňky**

Důsledkem poškození DNA u kmenů buněk, které nejsou schopné opravovat vzniklá poškození, je buněčná smrt.

## PŘEHLED BAKTERIÁLNÍCH TESTŮ GENOTOXICITY

- **model 1:**
- Amesův test – vznik histidin-prototrofních CFU (Ames et al., 1975)
  - Ara-test – vznik L-arabinóza-rezistentních CFU (Englesberg et al., 1962)
  - Ampicilínový test – vznik ampicilín-rezistentních CFU (Lee et al., 1994)
  - Reverzní test na *E. coli* – vznik tryptofan-rezistentních CFU (Bridges, 1972)
  - Mutatox – obnovení bioluminiscence buněk (Johnson, 1992)
  - GFP test – obnovená schopnost produkce GFP (Cariello et al., 1998)
- **model 2:**
- SOS chromotest – indukce přepisu *sulA::lac-Z* (Quillardet et al., 1982)
  - UmuC test – indukce přepise *umuC::lac-Z* (Oda et al., 1985)
  - SulA test – indukce přepisu *sulA::lac-Z* (El Mzibri, 1996)
  - RecA test – indukce přepisu *recA::luxCDABE* (Min et al., 1999)
  - Vitotox – indukce přepisu *recN::luxCDABE* (Van der Lelie et al., 1997)
  - Lux-fluoro test – indukce přepisu *recA::luxCDABE* (Baumstark-Khan et al., 2001)
- **model 3:**
- Reparační test – pokles počtu CFU v důsledku poškození DNA (Green, 1977)





## AMESŮV TEST I.

### Specifikace

- jednoduchý screeningový nástroj, který je nejčastěji používán a jako jediný všeobecně doporučován národními normami

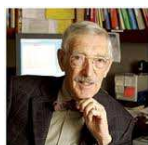
### Princip

- test je založen na indukci reverzních mutací v histidinovém lokusu v buňkách geneticky modifikovaného kmene *Salmonella typhimurium*
- reverzní mutace je spojena s přeměnou histidin-auxotrofních buněk (His<sup>-</sup>) na histidin-prototrofní (His<sup>+</sup>)
- histidin-prototrofní buňky jsou následně schopné růst v médiu bez přítomnosti aminokyseliny histidinu
- obnova růstu a metabolické aktivity je signálem genotoxických účinků testovaného vzorku

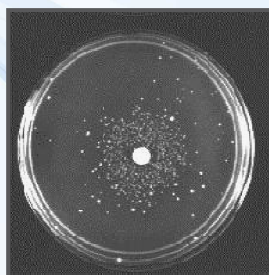


Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

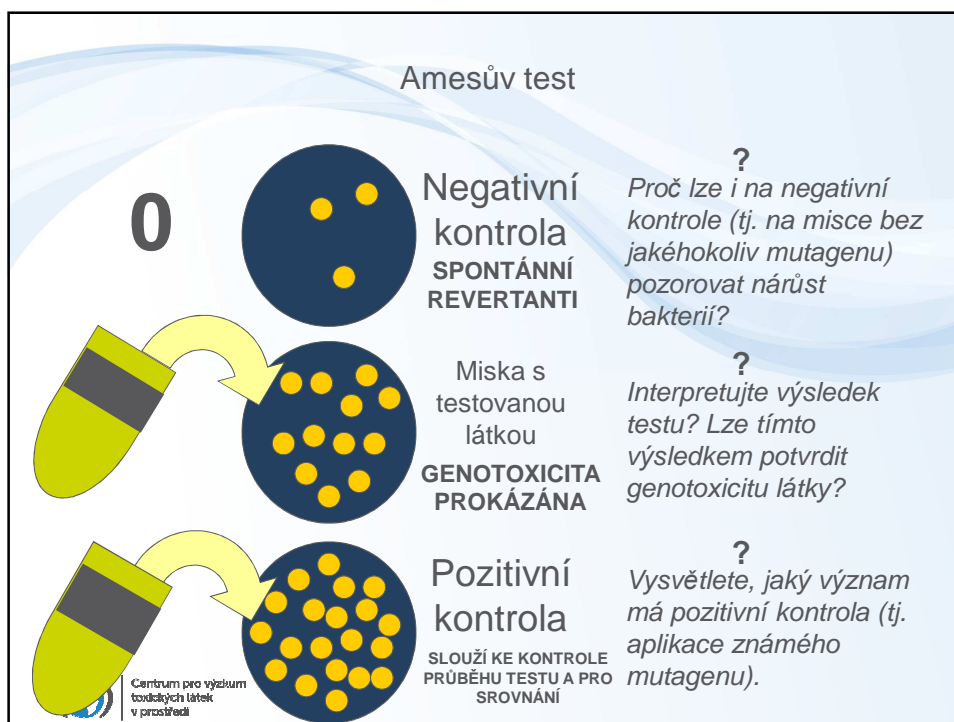
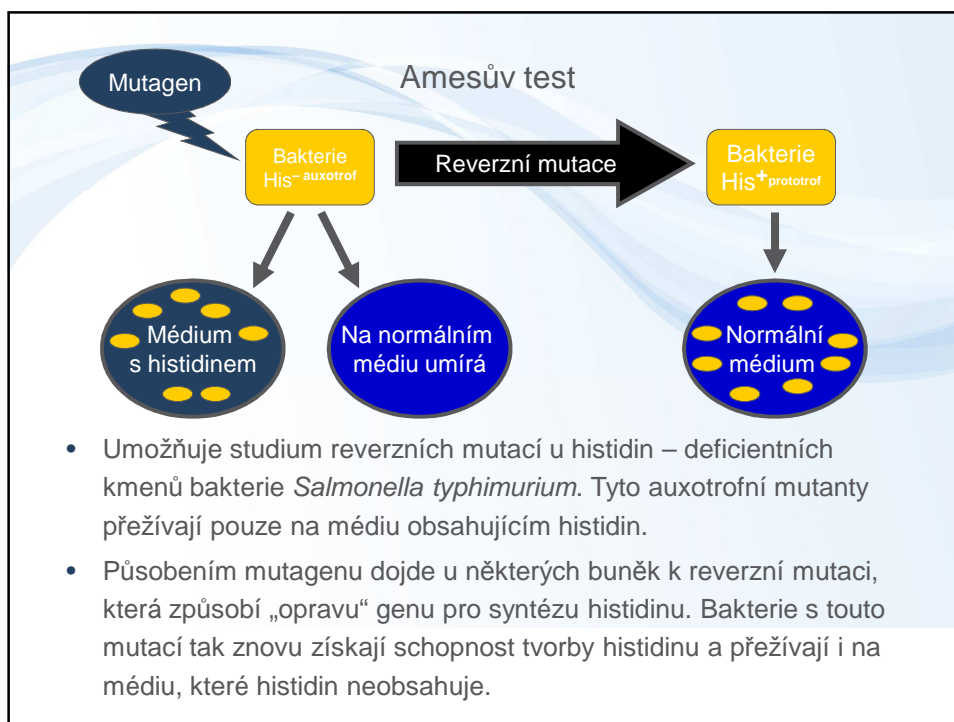
## Amesův test



*Bruce Ames (nar. 1928)*



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

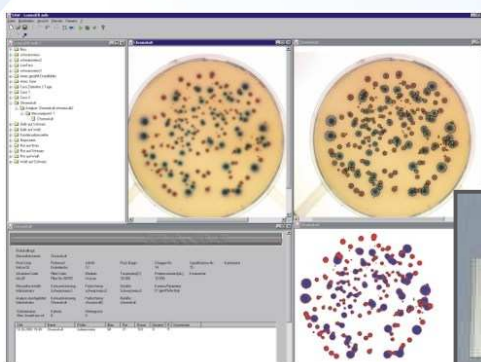


## Výsledek Amesova testu



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## Amesův test – automatické odečtení výsledků



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

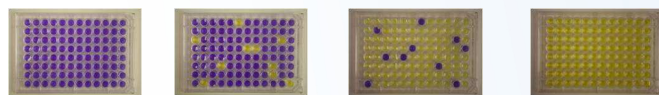
## AMESŮV TEST

### Fluktuální verze Amesova testu – Mutachromoplate™ (EPBI)

Vyhodnocení: počet pozitivních jamek (žluté) X negativní kontrola.

(statistické vyhodnocení – Poissonova distribuce).

Případně počítáme mutagenní aktivitu (M.A.).



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## MUTATOX I.

### Specifikace

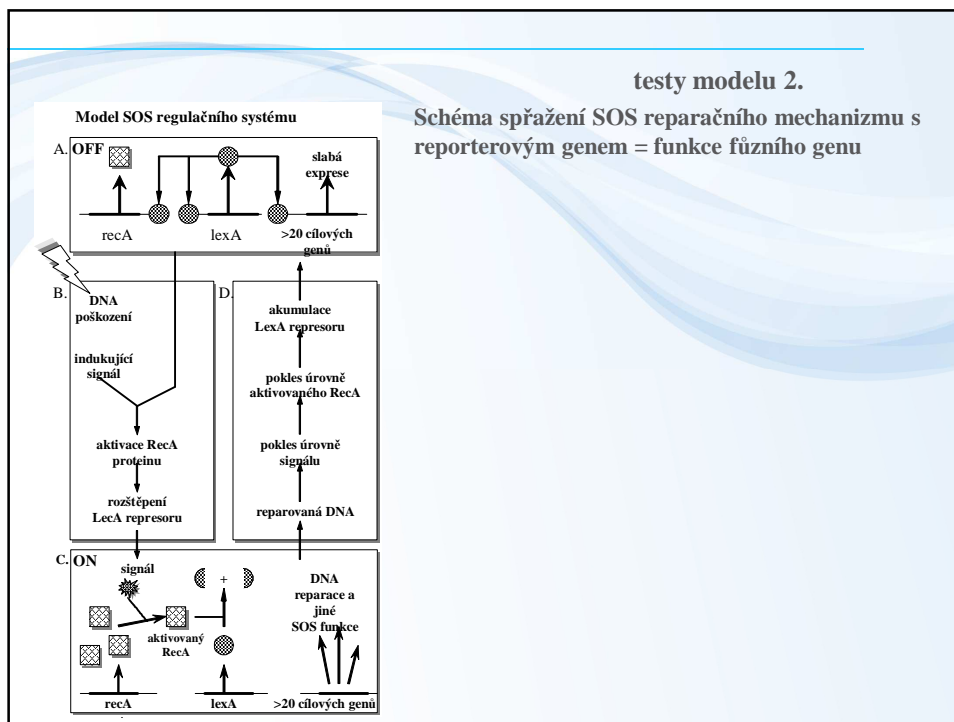
- krátkodobý, velmi citlivý screeningový test založený opět na indukce reverzních mutací (model 1.)

### Princip

- test je opět založen na indukcii reverzních mutací v důsledku iniciace substitucí, translokace, inhibice syntézy DNA nebo tvorby DNA aduktů genotoxickými látkami v luxCDABE operonu geneticky modifikované bakterie *Photobacterium phosphoreum* (*Vibrio fischeri*) M 169, která není schopná luminovat (dark cells)
- test probíhá v tekutém médiu !! v kyvetách, či mikrodestičkách
- v důsledku reverzní mutace je obnovena schopnost luminiscence buněk a na základě její kvantifikace je odhadován genotoxický potenciál testovaného vzorku



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



## SOS CHROMOTEST I.

sulA::lac-Z

### Specifikace

- jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

### Princip

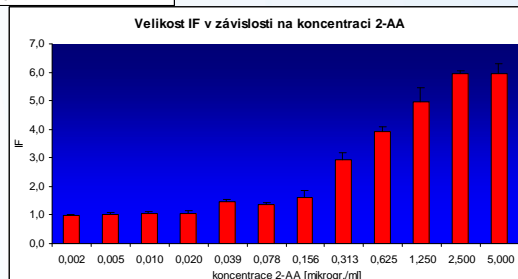
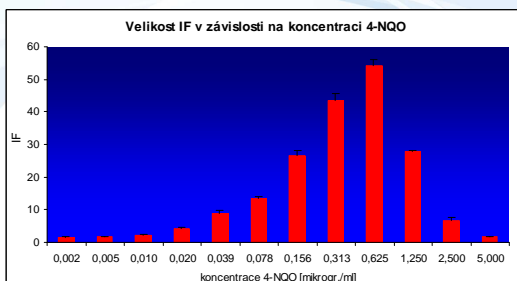
- podstatou SOS chromotestu je indukce SOS odpovědi v důsledku poškození DNA genotoxickou látkou
- ze skupiny SOS genů (din genů) je využíváno propojení sulA genu s reportérovým lac-Z genem
- cílenou genovou manipulací byl do kmene Escherichia coli PQ 37 vložen specifický fúzní gen sulA::lac-Z
- jako kontrola toxicity vzorku je kontinuálně bakterií syntetizována alkalická fosfatáza, jejíž pokles aktivity signalizuje inhibici buněk



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



## UMUC TEST X.



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## VITOTOX I.

### Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

### Princip

- podstatou Vitotoxu je opět indukce SOS odpovědi v důsledku poškození genomu testovacího kmene *Salmonella typhimurium*
- tentokrát je využíván geneticky manipulovaný kmen *Salmonella typhimurium*, jež obsahuje lux operon luxCDABE izolovaný z *Vibrio fischeri* a opatřený recN promotorem podléhající regulaci ze strany *lexA* proteinu (tedy fůzní gen *recN:luxCDABE*)
- reportérový operon je uložen v plasmidu pMOL1067 nebo pMOL1068



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



## recA TEST

### Specifikace

- Jednoduchý, rychlý, screeningový nástroj s miniaturizovaným provedením založený na stejném principu jako umuC test

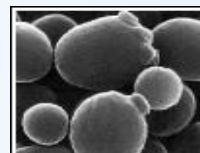
### Princip

- podstatou RecA je opět indukce SOS odpovědi v důsledku poškození genomu testovacího kmene *Escherichia coli* **DPD2794**
- tentokrát je využíván geneticky manipulovaný kmen *Escherichia coli*, jež obsahuje fúzní gen **recA::luxCDABE**
- Fúzní gen je tvořen bezpromotorovým operonem *lux operon luxCDABE* izolovaným z *Vibrio fischeri*, který byl opatřen promotorem recA genu podléhajícímu regulaci ze strany *lexA* proteinu
- reportérový operon je uložen v plazmidu



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

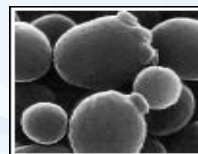
## TESTY GENOTOXICITY NA KVASINKÁCH



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

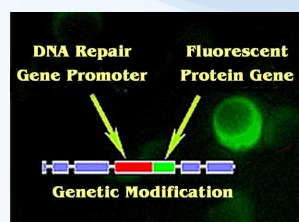


## ➤ RAD54 - GFP



Geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae*

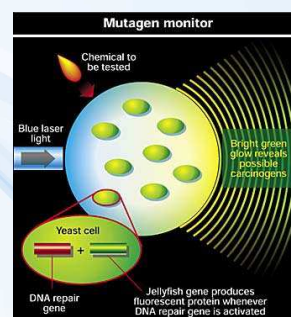
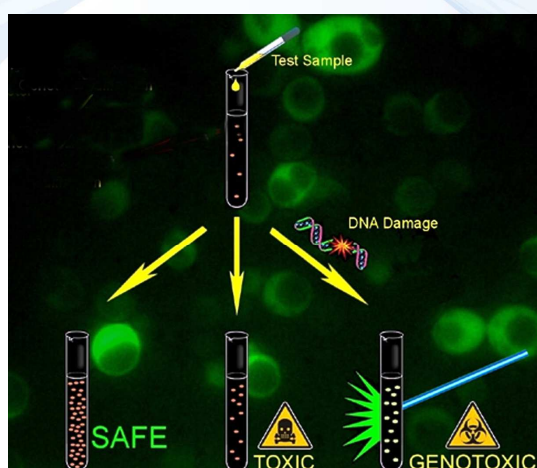
Kopie promotoru pro reparační gen umístěn před gen pro GFP protein vykazující fluorescenci



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

## ➤ RAD54 - GFP

Princip testu:

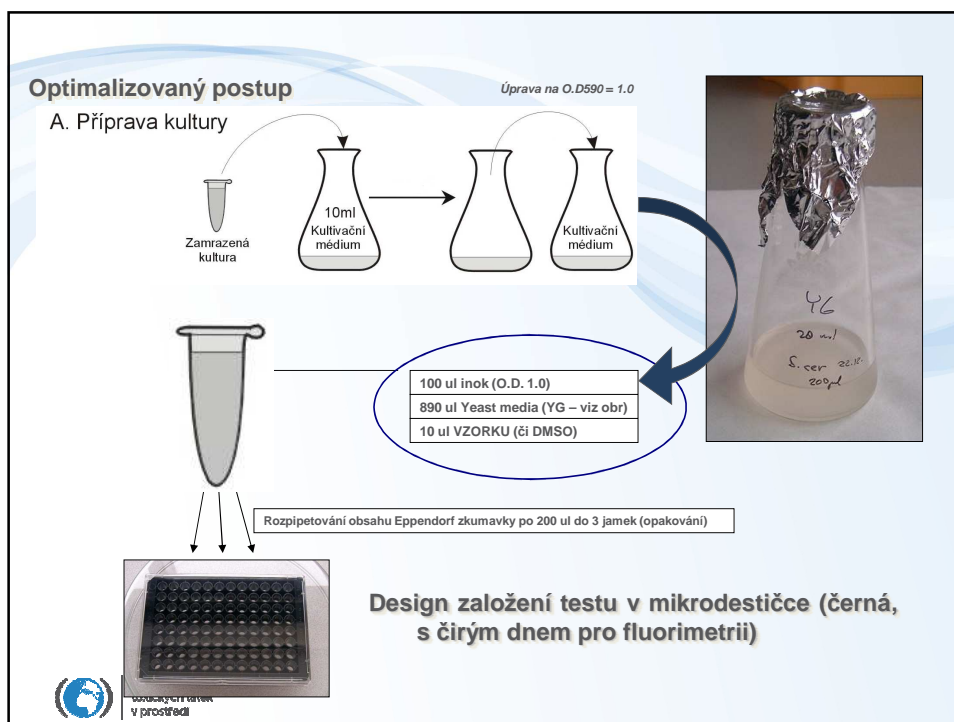


Po poškození DNA dojde ke spuštění reparačního procesu a tím i k produkci tohoto GFPproteinu, který je detekován měřením fluorescence

Paralelně sledování cytotoxicity měřením absorbance (A600)



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí



<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?GENETOX>

United States National Library of Medicine

**TOXNET**  
Toxicology Data Network

TOXNET Mobile Access | SIS Home | About Us | Site Map & Search | Contact Us

Env. Health & Toxicology | TOXNET | GENETOX

**Genetic Toxicology Data Bank (GENE-TOX)** – Peer-reviewed genetic toxicology test data for over 3,000 chemicals.

**Select Database**

- ChemIDplus
- HSDB
- TOXLINE
- CCRIS
- DART
- GENETOX
- IRIS
- ITER
- LactMed
- Multi-Database
- TRI
- Haz-Map
- Household Products
- TOXMAP
- TOXNET Home

**Search GENETOX**

(e.g. micronucleus positive styrene, calcium chloride, 139-06-0)

Search Clear Help

For chemicals, add synonyms and CAS numbers to search:  
 Yes  No

Limits Browse the Index

**Env. Health & Toxicology**

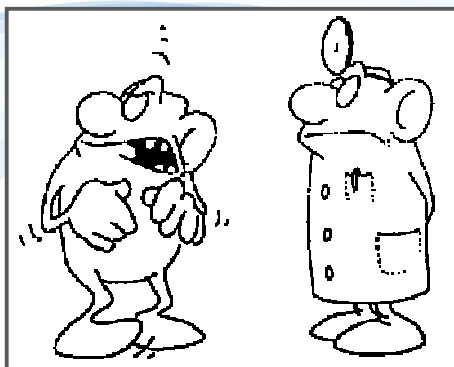
Portal to environmental health and toxicology resources

VISIT SITE

**Support Pages**

- Help
- Fact Sheet
- Sample Record
- TOXNET FAQ

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí



*„Možná, že se vám pane  
doktore zdá, že tady nikdo  
není.*

*Ale já ji tuším, tu bestii  
bakteriální!“*

*Kresba © Pavel Kantorek*

VIZITKA:



RNDr. Pavel Čupr, Ph.D.

[cupr@recetox.muni.cz](mailto:cupr@recetox.muni.cz)



Centrum pro výzkum  
toxicologických látek  
v prostředí