

VYBRANÉ FLUORESCENČNÍ TECHNIKY PRO VYHODNOCOVÁNÍ TESTŮ FYTOTOXICITY

Alan Gavel 1,2), Blahoslav Maršálek 1,2)

1) *BÚ AV ČR., Květná 8, 603 65 Brno, e-mail: marsalek@brno.cas.cz*

2) *RECETOX, Kamenice 126/3, 625 00 Brno*

Úvod

Biotesty s producenty se ve světě i v u nás používají více než 100 let. Jedním z důvodů je nesporný ekologický význam této skupiny organismů a také dobrý potenciál k jednoduchému a cenově dostupnému provedení testů. Tyto testy prošly postupným vývojem, ve kterém vznikly tři pomyslné skupiny – klasické (standardní) biotesty, mikrobiotesty a biosenzory. Pro biotesty jsou vhodné modelové organismy s vysokou citlivostí, nenáročnou kultivací, možností uchování v imobilizovaných či klidových stádiích a s malými nároky na prostor při testování. Testy fytotoxicity se dají vyhodnocovat mnoha způsoby; nejčastěji měřením a vážením, vizuálním srovnáním (např. defekty chlorofylu a zdravotní stav), dále existuje velká skupina metodik hodnotících metabolickou aktivitu (gazometrie, spektrofotometrie a fluorescence). V gazometrii se běžně měří spotřeba CO₂ nebo uvolňování kyslíku, spektrofotometricky se dá hodnotit nárůst počtu buněk (optická hustota) nebo enzymatické reakce s chromogenními substráty. Měření inhibice enzymů je však stále častěji hodnoceno fluorescenční detekcí z důvodů vysoké citlivosti metod a soustavného technického vývoje možností měřících přístrojů.

Příkladem využití detekce s fluorescenčním substrátem je hodnocení esterázové aktivity s fluoresceindiacetátem (FDA). FDA je lipofilní molekula bez fluorescence, která po rozštěpení v organismu a indukci světlem $\lambda = 488\text{nm}$ emituje fluorescenční záření při $\lambda = 530\text{nm}$ s autofluorescencí nad 620nm. Principem tohoto typu testů je snadný průnik substrátu a jeho přeměna na fluoreskující produkt v živých buňkách. Tato metoda umožňuje opustit testy s radioaktivním značeným uhlíkem ¹⁴C a vykazuje vysokou korelaci s fotosyntézou [4, 8]. Nevýhodou může být přítomnost esterázové aktivity jiných organismů (např. bakterií) v přírodním vzorku a do jisté míry také fakt, že se jedná o cizorodou látku.

Jedním ze směrů fluorescenční detekce je sledování přirozené emise záření z rostlinných pigmentů zejména z chlorofylu v reakčních centrech fotosystému II. (PSII.) u rostlin, řas a sinic. Fenomén fluorescence rostlinných barviv byl pozorován a popsán u vyšších rostlin již v roce 1934 Kautsky a Hirsch a dnes je běžně nazýván Kautského efekt (křivka). U tohoto typu fluorescence dochází k specifickému časovému průběhu, který se časem ukázal být dobrým ukazatelem různých fyziologických procesů spojených s fotosyntézou. Fotosyntéza je základním prvkem energetického metabolismu fotoautotrofních organismů a tak se jsou měřené parametry dobrým ukazatelem stavu (např. stresovaného) organismu [2]. Tento jev je výsledkem absorpce světelné energie v reakčních centrech. Část energie se přemění v teplo, dominantní část je využita ve fotochemických procesech fotosyntézy a zbytek je vyzářen jako fluorescenční záření (asi 3-5%) – pro podrobnější vysvětlení procesů viz. Govindjee, Barták [5, 10]

U měření kinetiky fluorescence chlorofylu existuje mnoho parametrů, ze kterých několik je základních a ostatní se z nich dají dopočítat (přehledně jsou vysvětleny v pracích Roháčka a Bartáka). Rozlišujeme dva stavy, ve kterých se materiál měří. Temnotně adaptovaný stav

(DAS) je navozen zatemněním po dobu nutnou na relaxaci reakčních center fotosystému II - odčerpání elektronů. Tato doba se liší pro jednotlivé rostlinné druhy, obecně se pohybuje okolo 15 minut a u řas a sinic bývá kratší. V tomto stavu se měří hodnoty F_0 a F_m . F_0 je intenzita fluorescence při velmi slabém, měřicím světle (ML), které nemá dostatečnou intenzitu nebo frekvenci pulzů pro nastartování fotochemických procesů. F_m je maximální fluorescence dosažená při silném saturačním světelném pulzu (SP). V tomto stavu jsou všechna reakční centra plně redukována (uzavřená), ale fotochemické procesy neběží. Při předpokladu stabilní tepelné disipace je tedy úroveň fluorescence v takových podmínkách maximální. Další hodnoty se dají získat u světelně adaptovaného materiálu (LAS). Tento stav je u organismu navozen při ozáření aktinickým světlem (AL), po kterém dochází k rychlému startu fotochemických procesů, což se odráží v časovém průběhu fluorescence. Po rychlém dosažení maxima (typicky do 1 s) dochází k pozvolnému poklesu. Na náběžné i sestupné hraně záznamu existuje několik lokálních vrcholů, které jsou odrazem konkrétních procesů při startu fotosyntézy. V LAS se dají získat hodnoty F_p , F_m' , F_s a následně F_0' . F_p je hodnota fluorescence v maximu při indukci aktinickým světlem, F_m' je hodnota maximální fluorescence při saturačním pulzu v LAS a F_s je hodnota ustálené fluorescence v LAS. Po vypnutí aktinického světla je možné měřit hodnotu základní fluorescence F_0' . Před tímto měřením by pro rychlé odčerpání elektronů a reoxidaci jejich přenašečů mělo předcházet ozáření světlem ze vzdálené červené oblasti (FR – far red light) [10].

Pro měření fluorescence chlorofylu se dají použít nedomulované fluorimetry s jedním zdrojem záření, které změří F_0 a F_m . Fluorimetry vybavené několika zdroji modulovaného světla umožňují měřit i další parametry. Pro výpočet některých parametrů je podstatná přítomnost zdroje světla FR $\lambda = 735\text{nm}$, které je klíčové při měření F_0' . Světelný zdroj pro měřicí a aktinické světlo může být společný, pokud je možnost změny frekvence a snížení intenzity ozáření při měření F_0 . Tento přístup je zvolen např. u přístrojů FluorCam, PSI.

Využití kinetiky fluorescence chlorofylu vyžaduje dobrou znalost procesů, kterých je odrazem. Jelikož sledované procesy velmi citlivě reagují na změny podmínek, může se snadno vyskytnout záznam, který by při mechanickém výpočtu parametrů podával nesmyslné informace. Před měřením spolehlivých výsledků je nutné nastavit parametry měření, které v ideálním případě odpovídají pokusným podmínkám. To může být obtížné např. z důvodů nízkých teplot u venkovních pokusů. Při měření bychom měli vzít v úvahu i koncentraci CO_2 , která dosahuje zvýšených hodnot v přítomnosti více lidí v nevětrané místnosti. Klíčovým prvkem úspěšného měření je nastavení úrovně jednotlivých světelných zdrojů. Vodítkem by měly být opět podmínky v pokusu, které by na druhou stranu měly být voleny tak, aby byly na daném přístroji aplikovatelné.

Využití metod fluorescenčního zobrazování

Oproti dnes již klasické metodě měření kinetiky založené na fotodetektoru skýtá využití kamer nové možnosti, které jsou vykoupeny hlavně pomalostí záznamu. Běžně používané přístroje s CCD kamerou neposkytují dostatečně rychlý sběr dat pro sledování rychlé Kautského kinetiky (probíhá většinou do 1s od ozáření). Je to dáno optickými vlastnostmi objektivu (světelnost) v kombinaci s citlivostí CCD prvku. Další bariéru představuje on-line digitalizace obrazu, která je dána rychlostí přenosu datové sběrnice. Rostoucí rozlišení obrazu znamená snížení frekvence sběru snímků. Pro snížení datového toku se používá černobílý záznam, kdy je bariérovým filtrem propuštěn převážně signál (s vlnovou délkou) emise z PSII.

Proti rychlým ale zjednodušeným informacím z fotodetektoru umožňuje fluorescenční zobrazování sledování heterogenity objektu. Tato možnost nachází uplatnění např. při sledování lišejníkové stélky, listů rostlin, nárůstu perifytonů nebo kolonií sinic či řas apod. Kromě hustých suspenzí čistých kultur řas a sinic je nutné počítat s heterogenitou autotrofního materiálu.

V testech toxicity můžeme metodu zobrazování využít pro současné měření ředící řady a kontroly. Tato myšlenka byla na našem pracovišti uplatněna při měření na přístroji FluorCam 690M firmy PSI. Pro vyhodnocení řasových testů v 96 jamkových mikrodestičkách byly použity fluorescenční proměnné F_0 a F_m a základní fluorescenční parametr F_v/F_m ($F_v = F_m - F_0$) spolu s NPQ. F_0 je většinou uváděn jako ukazatel biomasy, v krátkodobém měřítku reaguje např. na změny teploty ale i na toxický stres. Na rozdíl od zvyšování hodnot F_0 se hodnoty F_m při vlivech toxikantů snižuje. Poměr F_v/F_m má u zdravé rostliny hodnoty okolo 0,83 u řas a sinic bývá nižší. Při stresu dochází k jeho snižování. NPQ znamená nefotochemické zhášení, které se zjednodušeně mírou disipace na teplo. Počítá se jako z proměnných maximální fluorescence temnotního a světelně adaptovaného stavu ($NPQ = F_m - F_m' / F_m'$). Tento parametr roste se zatížením a z principu použitých proměnných jsou jeho záporné hodnoty pouze artefakty špatně nastavených podmínek. Cílem těchto testů bylo hlavně nabídnout rychlou alternativu standardním 72 hodinovým testům. Z důvodů citlivosti detektoru bylo přistoupeno ke zvýšení hustoty inokula v testu na hodnoty řádově shodné s nárůsty ve standardním testu po třech dnech expozice. Z důvodu nenormality rozložení dat byly pro hodnocení použity neparametrické metody Kruskal-Wallis ANOVA a následně Mann-Whitney U test. Výsledkem byly hodnoty LOEC, tedy nejnižší koncentrace s pozorovaným statisticky významným ($p < 0,05$) efektem. Ve srovnání se standardními třídenními testy bylo převážně dosahováno nižší citlivosti o dva až tři řády (těžké kovy, formaldehyd, Roundup), ale efekty byly pozorovatelné již po 4 hodinách s doporučením pro 6 hodinové měření. Dobrým výsledkem byla i pozorovaná robustnost testu v přítomnosti zákalu. Test se neukázal být významně ovlivněn trofii média [7].

Zvýšení citlivosti fluorescenčního řasového testu očekáváme od úpravy expozice a změny měřicího protokolu, na kterém se v současnosti pracuje. Expozice v mikrodestičkách s několikanásobným měřením by mohla být stresovým faktorem ovlivňujícím výsledky řasového testu. Z toho důvodu jsou řasy či sinice exponovány v skleněných baňkách a před měřením je odebrán alikvot do destiček z komerčně dostupného testu Rotoxkit. Tyto destičky byly vybrány hlavně z důvodu nízkých jamek, které umožňují dobrý záznam celé jamky objektivem bez „stínění“ okrajem jamky. Další zvýšení citlivosti by mohlo znamenat nasazení parametru F_q/F_m kde $F_q = F_m - F_{s1}$ [6]. F_{s1} je definována jako úroveň fluorescence v prvním lokálním minimu sestupné strany Kautského světelné kinetiky. Autoři na výsledcích s polycyklickými aromatickými uhlovodíky (PAH) zaznamenali dobrou korelaci tohoto parametru s F_v/F_m poměrem a stejně tak i v růstovém testu u *Lemna giba*.

Na stejném přístroji byla provedena série testu vyšších rostlin s *Lepidium sativum*, *Brassica rapa* a *Lemna minor*. Tyto testy byly použity jako nástroj pro detekci možného environmentálního stresu vodních i suchozemských rostlin zasažených vodou obsahující microcystiny. Tyto velmi stabilní biotoxiny jsou produkovány sinicemi vodního květu, který pravidelně dominuje eutrofním nádržím v teplejších částech roku. Z biomasy sinic byly frakcionací SPE na C-18 kolonách izolovány vzorky s obsahy microcystinů a pigmentů. Byly testovány i vzorky se surovým obsahem biomasy sinic. U *B. rapa* bylo navíc provedeno srovnání se standardními metodami hodnocení v podobě délky hypokotylu, kořene a hmotnosti jednotlivých rostlin. Měřené proměnné a fluorescenční parametry byly shodné jako v případě prvního zmíněného pokusu. Statistické vyhodnocení bylo rovněž shodné s dříve

zmíněným experimentem s výjimkou hodnocení standardních parametrů, u kterých bylo možno použít parametrických metod ANOVA. Výsledky prokázaly toxický vliv microcystinu. Použité koncentrace byly získány ze zahuštěné biomasy sinic. K takové kumulaci ale může v přírodě docházet při nafoukání vodního květu v zátokách. Navíc se jednalo o 48 a 72 hodinové akutní testy, takže se dá předpokládat, že u chronické expozice by se efekty mohly projevit už při běžných koncentracích ve vodách ze zasažených nádrží. Nejsilnější efekty se ovšem projeví u surového extraktu sinic, kde se uplatní další nestanovené inhibitory [9]. To potvrzuje důležitost ekotoxikologických biotestů při analýze environmentálních vzorků, kde by klasický chemický přístup v tomto případě spoléhal pouze na sledování známého biotoxinu a podhodnotil riziko plynoucí z nebezpečnosti ostatních přítomných toxikantů. V porovnání s vyhodnocením standardních parametrů u *B. rapa* se fluorescenční detekce ukázala jako citlivější a méně náročná na provedení. V poslední době se objevily studie, ve kterých je fluorescenční test s *Lemna giba* označován za citlivou metodu detekce polutantů prostředí [3, 6].

Relativně složitější je nasazení této metody pro sledování metabolické aktivity lišejníků, které jsou dobrým bioindikačním organismem. U této skupiny je třeba vybrat dostatečně rozšířeného zástupce, který s vhodnou citlivostí k polutantům. Vzhledem ke způsobu měření je výhodné, pokud jeho stélka bude co nejvíce plochá, u keříčkových stélek je problém s homogenním osvětlením i se snímáním fluorescence, které by mělo spíše orientační charakter. Jelikož je lišejník symbiotickým organismem fotobiontů a hub, je výhodné, pokud houbové hyfy neobsahují barviva výrazně absorbující v oblasti vlnové délky emise PSII. Klíčovým prvkem při měření s lišejníky je rovněž nasycení stélky vodou [1]. Podobným stylem se dají hodnotit aerická společenstva řas, mechů a lišejníků. Nejjednodušším postupem hodnocení může být hodnocení fotosyntetické aktivity (F_p nebo F_v/F_m) a její plošné zastoupení na hodnoceném objektu vyjádřené histogramem aktivit. U obou těchto skupin se dá hovořit o ekotoxikologických testech, které v porovnání s klasickými toxikologickými testy mají malou možnost standardizace, ale vysokou ekologickou relevanci. Dobře tak zapadají do posledních trendů v ekotoxikologii a pokud se podaří dořešit některé problémy spojené s jejich hodnocením, budou jistě cenným nástrojem při hodnocení ekologických rizik. Nové možnosti této techniky se jistě vynoří jakmile budou dostupné přístroje pro fluorescenční zobrazování snadno použitelné přímo v terénu.

Dalším využitím metod fluorescenčního zobrazování je sledování mikroskopických kolonií autotrofních organismů. Tato metoda může přinést cenné informace o ročním cyklu těchto organismů. Pro vodárenství a hygienické účely je obzvláště zajímavá možnost sledovat ožívání a fyziologický stav kolonií řas a sinic. Velmi účinnou kombinací je nalezení buněk či kolonií a jejich případná identifikace standardní světelnou mikroskopií, zjištění oživenosti a základních taxonomických skupin fluorescenční mikroskopií a kvalitativní analýza aktivity fotoautotrofních organismů. Ta se dá provést s mikroskopem vybaveným fotodetektozem či metodami pulzně amplitudové modulace (PAM) a fluorescenčního zobrazování. V současnosti se pracuje na využití mikroskopové verze přístroje Fluorcam (modulovaný fluorimetr, PSI, mikroskop Olympus BX-60) k sledování kolonií sinic rodu *Microcystis* a predikci jejich masového rozvoje v nádržích. Tato metoda by ale měla být použitelná i pro kolonie či buňky ostatních fotoautotrofních mikroorganismů.

Závěr

Metody založené na sledování výtěžku fluorescence chlorofylu u fotoautotrofních organismů prošly v posledních 30. letech intenzivním vývojem. V dnešní době existuje řada přístrojů, na kterých se dají měřit fluorescenční proměnné (PSI, Walz, Hansatech ad.). Jsou definovány parametry, ze kterých se dá soudit na inhibici vzorkem. Problémy spojené s rutinním nasazením těchto technik při testech toxicity jsou spojeny s poměrně náročným nastavením měřicího protokolu u některých testovacích organismů. Cena měřících zařízení také zatím není zanedbatelná. S prudkým rozvojem digitálního záznamu obrazu budou překonány i některé nevýhody fluorescenčního zobrazování oproti integrujícím fotodetektorům. Při překonání zmíněných problémů nabízí tato metoda univerzální nástroj pro hodnocení širokého spektra pokusných organismů či společenstev organismů. Velkou výhodou těchto metod je potenciál využití ekologicky relevantních organismů v ekotoxikologii. V dnešní době se tato metoda stává nejen výborným zdrojem informací pro rostlinné fyziology, ale stále častěji se objevuje i praktické nasazení v toxikologii a ekotoxikologii.

Použitá literatura

- [1] BARTÁK, M., J. HÁJEK, AND J. GLOSER, *Heterogeneity of Chlorophyll Fluorescence over Thalli of Several Foliose Macrolichens Exposed to Adverse Environmental Factors: Interspecific Differences as Related to Thallus Hydration and High Irradiance*. *Photosynthetica*, 2000. **38**(4): p. 531-537.
- [2] BOLHÁR-NORDENKAMPF, H.R. AND G. ÖQUIST, *Chlorophyll Fluorescence as a Tool in Photosynthesis Research*, in *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*, D.O. Hall, et al., Editors. 1993, Chapman and Hall: London. p. 193-206.
- [3] DEWEZ, D., M. MARCHAND, P. EULLAFFROY, AND R. POPOVIC, *Evaluation of the Effects of Diuron and Its Derivatives on Lemna Gibba Using a Fluorescence Toxicity Index*. *Environmental Toxicology*, 2002. **17**(5): p. 493-501.
- [4] GALA, W.R. AND J.P. GIESY, *Flow Cytometric Determination of the Photoinduced Toxicity of Anthracene to the Green Alga Selenastrum Capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1994. **13**(5): p. 831-840.
- [5] GOVINDJEE, *63 Years since Kautsky - Chlorophyll-a Fluorescence (Vol 22, Pg 131, 1995)*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 1995. **22**(4): p. 711-711.
- [6] MALLAKIN, A., T.S. BABU, D.G. DIXON, AND B.M. GREENBERG, *Sites of Toxicity of Specific Photooxidation Products of Anthracene to Higher Plants: Inhibition of Photosynthetic Activity and Electron Transport in Lemna Gibba L. G-3 (Duckweed)*. *Environmental Toxicology*, 2002. **17**(5): p. 462-471.
- [7] MARTINEK, J., *Hodnocení Akutních Řasových Testů Toxicity Metodou Fluorescence Imaging*, in *Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii*. 2002, Masarykova univerzita: Brno. p. 65 + literatura a přílohy.
- [8] NYHOLM, N. AND B.M. DAMGAARD, *A Comparison of the Algal Growth-Inhibition Toxicity Test Method with the Short-Term C-14 Assimilation Test*. *Chemosphere*, 1990. **21**(4-5): p. 671-679.
- [9] PLÍŠKOVÁ, M., *Fytotoxicita Sinic*, in *Katedra chemie životního prostředí a ekotoxikologie*. 2001, Masarykova univerzita: Brno. p. 71 + přílohy.
- [10] ROHÁČEK, K. AND M. BARTÁK, *Technique of the Modulated Chlorophyll Fluorescence: Basic Concepts, Useful Parameters, and Some Applications*. *Photosynthetica*, 1999. **37**(3): p. 339-363.