

Environmentální toxikologie

podzim 2015/2

Základní baterie testů toxicity

- testy mutagenity/genotoxicity;
- testy teratogenity;
- řasové testy;
- testy fytotoxicity na vyšších rostlinách;
- testy na prvocích;
- testy na rybách a korýších;
- kontaktní testy – organismy žijící v sedimentech;
- testy s organismy žijícími v půdě; terestrické testy;
- testy toxicity s terestrickými obratlovci;
- testy toxicity s destruenty;

Základní baterie testů toxicity

- testy jsou často optimalizovány a standardizovány;
- nádoby a jejich objem;
- teplota vody a další parametry (pH, obsah iontů);
- fotoperioda;
- optimalizované stáří organismu používaného v testu;
- standardizovaná kvantifikace;

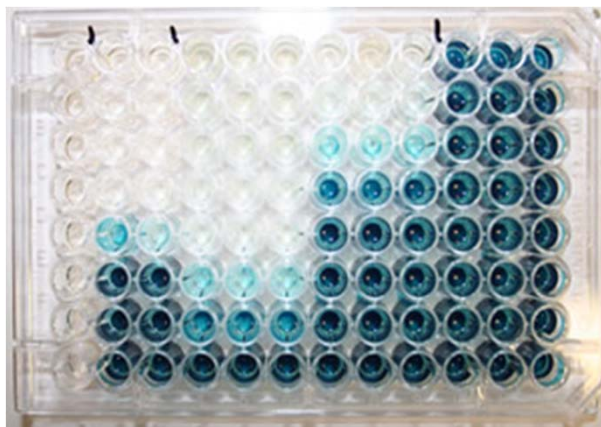
Testy toxicity využívající destruenty

Z hlediska funkčnosti daného ekosystému hrají destruenti, tedy organismy rozkládající organickou hmotu, velmi významnou roli, nicméně spektrum testů zaměřených na tuto skupinu je poměrně omezené:

- vesměs bakteriální testy;
- základní laboratorní model představuje mořská bakterie *Vibrio fischeri*, které produkují světlo;
- test je založen na zhášení bioluminiscence; existuje i varianta vhodná pro testování mutagenity – Mutatox;
- další varianta – růstové testy s bakteriemi *E. coli* nebo *Pseudomonas putida*;
- rychlé bakteriální testy toxicity – např. Toxi-Chromo test

Testy toxicity využívající destruenty

Toxi-Chromo test – bakteriální test založený na schopnosti toxikantů a antibiotik blokovat *de novo* tvorbu β -galaktosidázy ve specifickém kmenu *E. coli*. Tento kmen je vysoce citlivý např. na pesticidy, mykotoxiny, těžké kovy. Baktérie kultivované za stresujících podmínek (inhibují syntézu β -galaktosidázy) jsou smíchány s látkami umožňujícími jejich zotavení a induktorem β -galaktosidázy.



Testy toxicity využívající destruenty

Pro přímé posouzení půdních a dalších mikroorganismů jsou používány specifické testy :

- měření mikrobiální aktivity – spotřeba kyslíku, nitrifikace, enzymatické aktivity;
- test respirační aktivity půdy – stanovení produkce CO_2 ;
- asimilace dusíku – metoda redukce ethinu (acetylénu) – je detekován vznikající ethen;
- test nitrifikační aktivity půdy – do půdy se přidá substrát – analýza koncentrace amonných, dusitanových a dusičnanových iontů;

Testy toxicity využívající destruenty

- testy enzymatických aktivit:
- test dehydrogenázové aktivity – prokazuje přítomnost aktivních mikroorganismů (vč. hub a dalších) – degradace dehydrogenáz probíhá po smrti organismů velmi rychle – měřítko toxicity; princip testu analogie MTT testu – jako detektor jsou používány tetrazoliové soli TTC a INT – měří se tvorba barevného formazanu;
- testy aktivity hydroláz

Řasové testy toxicity

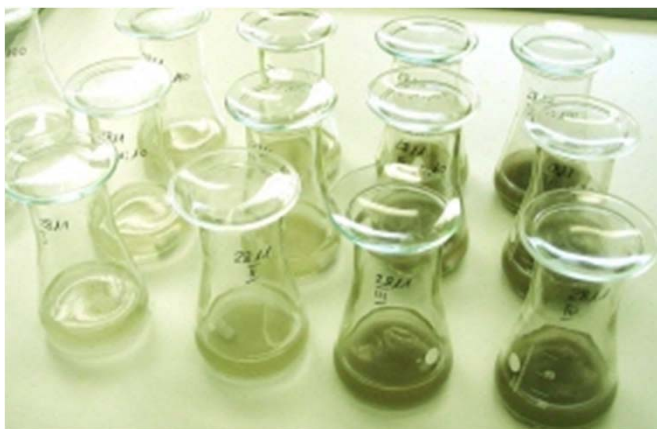
Řasové testy toxicity – testy toxicity na producentech:

- výhoda - na rozdíl od vyšších rostlin jsou rychlejší, dají se snadno kvantifikovat a miniaturizovat;
- varianty pro akutní i chronickou toxicitu - řada standardizovaných testů podle OECD i ISO norem;
- sladkovodní řasy – *Scenedesmus*, *Pseudokirchnerella*, *Chlorella vulgaris*;
- sinice – *Microcystis aeruginosa*, *Anabena*;
- mořské organismy – *Dunaliella*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*;

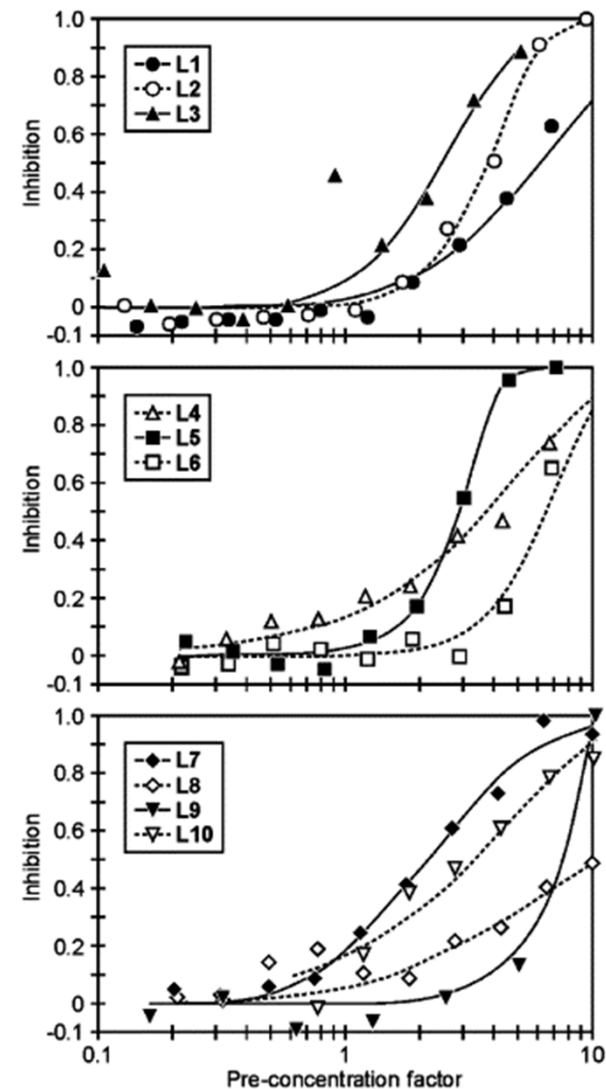
Řasové testy toxicity

Modifikace:

- statický vs. průtokový test;
- varianty pro akutní i chronickou toxicitu;
- detekce – počty buněk, fluorescenční detekce, spektrofotometrie, ale i sofistikovanější metody



zdroj: <http://www.ibacon.com/index.php/algat.html>



Baun a kol., Water Res., 2004

Testy toxicity na vyšších rostlinách

Test inhibice růstu okřehku *Lemna minor*:

- standardizovaný test (OECD 221, Regulation (EC) No 440/2008, C.26, DIN EN ISO 20079);
- výhoda – pohlcování světla v tmavých roztocích neovlivňuje růst okřehku;
- test se provádí v kádinkách – sleduje se nárůst stélek (fronds), případně hmotnost biomasy a obsah chlorofylu;



Testy toxicity na vyšších rostlinách

Existuje velké množství modifikací testů fytotoxicity:

- liší se druhem testovaného organismu, testovacími podmínkami i sledovaným end-pointem;
- můžeme hodnotit např. klíčivost semen, počet a úhyn rostlin, hmotnost biomasy, opad listů, tvar a počet plodů, biochemické parametry – obsah chlorofylu, intenzita respirace;
- možnosti využití – testování herbicidů, testování kontaminace v rámci rekultivací a sanací znečištěného území;
- kombinované testy – např. mutagenita a fytotoxicita;
- testovací organismy – klasické polní plodiny, ale i rostliny typické pro danou lokalitu; *in situ* a terénní studie;

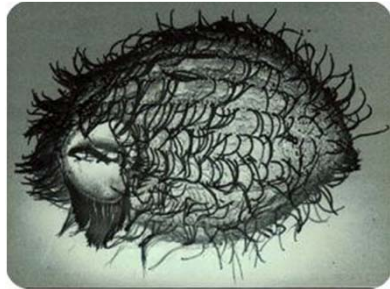
Testy toxicity na vyšších rostlinách

- krátkodobé vs. dlouhodobé testy;
- kultivace v in vitro podmínkách;
- hydroponie;
- kalusové testy;

Testy toxicity na prvocích

- prvoci mají řadu výhod v testech toxicity – krátký životní cyklus, snadná kultivace a většinou vysoká citlivost vůči toxikantům;
- hrají významnou roli ve zpracování organické hmoty a jsou široce rozšířeni např. v čistírenských kalech – využití pro studium toxicity odpadních vod;
- mezi používané prvoky patří např. nálevníci rodů *Tetrahymena* a *Spirostomum*;
- akutní testy i chronické multigenerační testy;
- můžeme sledovat nárůst populace prvoků nebo také úbytek substrátu, který jim slouží jako potrava;

Testy toxicity na prvocích



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

- komerční test PROTOTOXKIT
 - obrvenka *Tetrahymena thermophila*;
 - spektrofotometrická detekce – klesající OD substrátu odpovídá nárůstu populace – 24 h test
-
- podobně jako u dalších typů testů využívajících mikroorganismy jsou snahy o miniaturizaci a automatizaci – formát 96 j. destiček – detekce např. MTT test

Testy toxicity na korýších

Testy toxicity na perloočkách:

- test toxicity na hrotnatce velké *Daphnia magna*;
- analogické testy – *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*, blešivci rodu *Gammarus*;
- standardizovaný test;
- akutní toxicita (24 h, 48 h);
- test inhibice reprodukce (21 dní);
- testy se používají pro analýzu toxicity průmyslových chemikálií, odpadních vod, suspenzního materiálu, pórové vody sedimentů i různých typů extraktů;

Testy toxicity na korýších



Akutní expozice:

- hrotnatky jsou v kádinkách inkubovány s testovanou látkou a po stanovené době je sledována imobilita (letalita);

norma: ČSN EN ISO 6341 Kvalita vod – Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Zkouška akutní toxicity

Chronická expozice:

- po dobu 21 dní jsou hrotnatky kultivovány v přítomnosti toxikantu a průběžně je zaznamenáván počet snůšek a narozených jedinců;

norma: např. OECD „*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test“

Testy toxicity na korýších

Další možné skupiny testů:

- test toxicity na žábřonožkách *Artemisia salina*; např. testování vzorků s vysokým obsahem solí; není příliš používán;
- test na korýších *Thamnocephalus platyurus*; ISO 14380:2011 Water quality -- Determination of the acute toxicity to *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea, Anostraca); rychlý test – 24 h nebo 60 min, komerční kity
- testy toxicity na vířnících (*Rotatoria*) druhy rodu *Brachionus* – akutní test toxicity (ztráta hybnosti), test inhibice příjmu potravy (barevný substrát) – mikroskopická detekce;

Testy toxicity na rybách

Ryby představují vedle vývojových testů na obojživelnících jedinou skupinu obratlovců, která je široce využívána k testům toxicity:

- nejčastěji užívaný sladkovodní druh – pstruh duhový *Oncorhynchus mykiss*; inhibice růstu rybího plůdku – expozice 14/28 dní – sleduje se přírůstek hmotnosti a délky každé ryby;
- varianta akutního testu – test na izolovaných hepatocytech pstruha duhového – sleduje se viabilita buněk;



Testy toxicity na rybách

- analogické testy lze provádět na akvariijních rybách:
- danio pruhované (*Danio rerio*), medaka japonská (*Oryzias latipes*);
- vedle toho je možné na nich provádět další specifické testy – např. akutní test mortality (96 h), test toxicity na jikrách *B. rerio*;
- výhoda – snadný chov, možnost využití k sofistikovanějším analýzám, vč. testů embryotoxicity a teratogenity;
- testy na mořských rybách: *Cyprinodon*, *Fundulus heteroclitus*, *Menidia*;

Kontaktní testy toxicity – organismy žijící v sedimentech

Vodní sedimenty mají řadu specifík – lépe je testovat je v intaktní podobě:

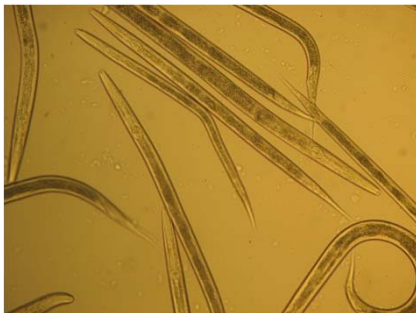
- zadržují lipofilní toxické organické látky a kovy, obsahují složku pevnou i vodnou, které jsou důležité pro celkovou toxicitu; problém biodostupnosti;
- primární model – různonožec *Hyallela azteca*;
- testy na larvách pakomára *Chironomus riparius*, nítěnkách;



Testy toxicity – organismy žijící v půdě nebo povrchovém substrátu

Podobně jako sedimenty mají půdy řadu specifických vlastností – lépe je testovat je v intaktní podobě:

- testy na hlísticích
- *Panagrellus redivivus*; *Caenorhabditis elegans*;
- *P. redivivus* – 24 hodinový test mortality (nebo delší test na přítomnost gentoxických látek); chovají se v nádobách ve směsi vody a mouky (+ jako potrava – kvasinky); používají se pouze juvenilní jedinci – v jamkách destiček (postačuje objem 2,5 ml);



zdroj: <http://en.wikipedia.org>



Testy toxicity – organismy žijící v půdě nebo povrchovém substrátu

- *C. elegans* – výhoda může být použit jak umělý substrát, tak přímo půda; pro test se používají mladí (3-4 dny) stejně staří jedinci; expozice po dobu 24 h nebo delší – na konci testu je odečten počet živých a mrtvých jedinců;
- standardizovaný test:
 - ISO 10872:2010 Water quality -- Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda)

Testy toxicity – organismy žijící v půdě nebo povrchovém substrátu

- test toxicity na žížalách – vhodný model jako organismus přispívající k tvorbě půdy, který může přijímat toxikanty jak povrchem těla, tak zažívacím traktem; používá se buď *Eisenia fetida/andrei* nebo *Lumbricus terrestris*;
- normovaný test (ISO 11268-1:2012 Effects of pollutants on earthworms -- Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*);
- akutní test (48-72 h) na filtračním papíru – vodné vzorky nebo výluh vzorků na filtračním papíru – příjem toxikantů pouze pokožkou – stanovuje se mortalita;
- akutní test přímo v půdě – umělá zemina (písek, jíl, kompostový substrát) s vysokým podílem vody, doba expozice – 28 dní;

Testy toxicity – organismy žijící v půdě nebo povrchovém substrátu

- test reprodukce na žížalách – jedinci jsou individuálně pěstováni 4 týdny a vyhodnocuje se počet kokonů a narozených jedinců;
- alternativa – testy na roupicích *Enchytraeus crypticus*, *Enchytraeus albidus* - OECD (Enchytraeid Reproduction Test No.220/2004); reprodukční test; únikový test;
- test inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia fimetaria*, *Folsomia candida*);

Testy toxicity na dalších bezobratlých

- k testování bývají využívány i další druhy terestrických bezobratlých, které reprezentují jiné významné skupiny organismů nebo cíle specifických toxikantů;
- hlemýžď kropenatý (*Cornu aspersum*) – toxický účinek na vývoj juv. jedinců (chronická 4-týdenní expozice) – detekuje se inhibice růstu a mortalita;
- zlatohlávek tmavý (*Oxythyrea funesta*) – „Effects of pollutants on insect larvae (*Oxythyrea funesta*) - Determination of acute toxicity“ ISO 20963:2005 ; mortalita larev exponovaných v kontaminované půdě;
- testy toxicity na včelách – především sledování toxicity agrochemikálií;

Testy toxicity na obratlovcích

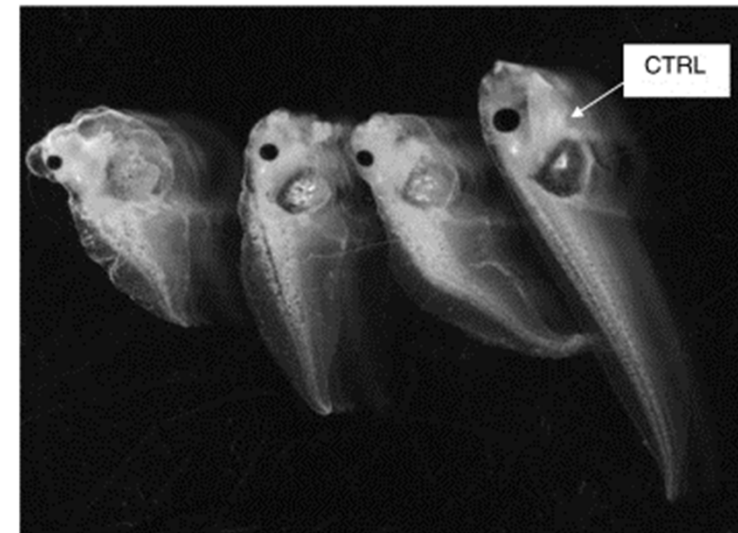
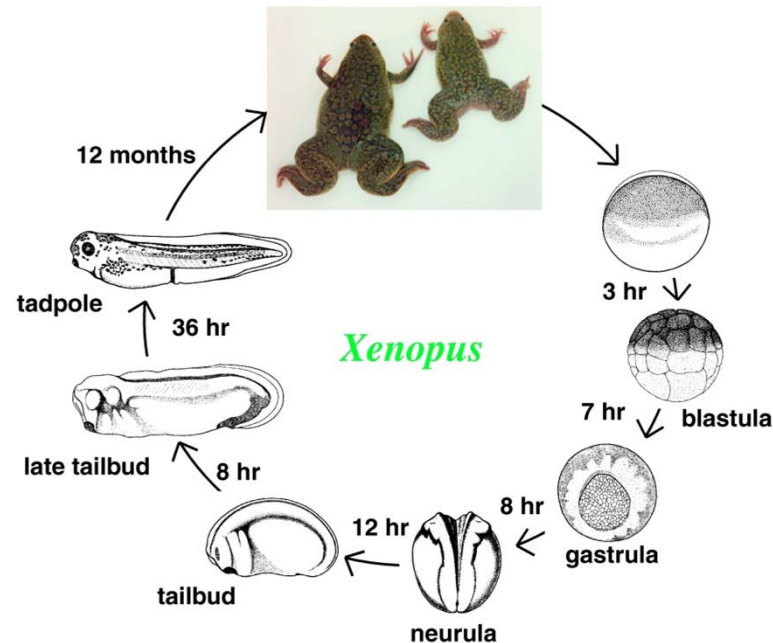
Kromě ryb nejsou obratlovci užíváni k rutinnímu stanovení toxicity – uplatňují se spíše ve výzkumu:

- vedle ryb bývají ke sledování toxicity používány také některé druhy obojživelníků pěstovaných v laboratorních podmínkách, především drápatky; citlivost raných vývojových stádií;
- testy toxicity na ptácích – látky které by je mohly ohrozit – např. pesticidy; jako modelové organismy mohou být použity křepelky japonské nebo bažant obecný; dlouhodobější testy reprodukce a mortality;
- testy orální toxicity na laboratorních potkanech (90 dní) – toxicita, histologická analýza, biochemické analýzy – většinou jsou testovány látky potenciálně nebezpečné pro lidskou populaci;

Testy teratogenity

FETAX – Frog Embryo Teratogenity Assay Xenopus:

- metoda standardizovaná ASTM a využívající embrya drápatky *Xenopus laevis*;
- rychlý test pro identifikaci vývojových toxikantů;



500 μ M Cr(VI)

Testy mutagenity/genotoxicity

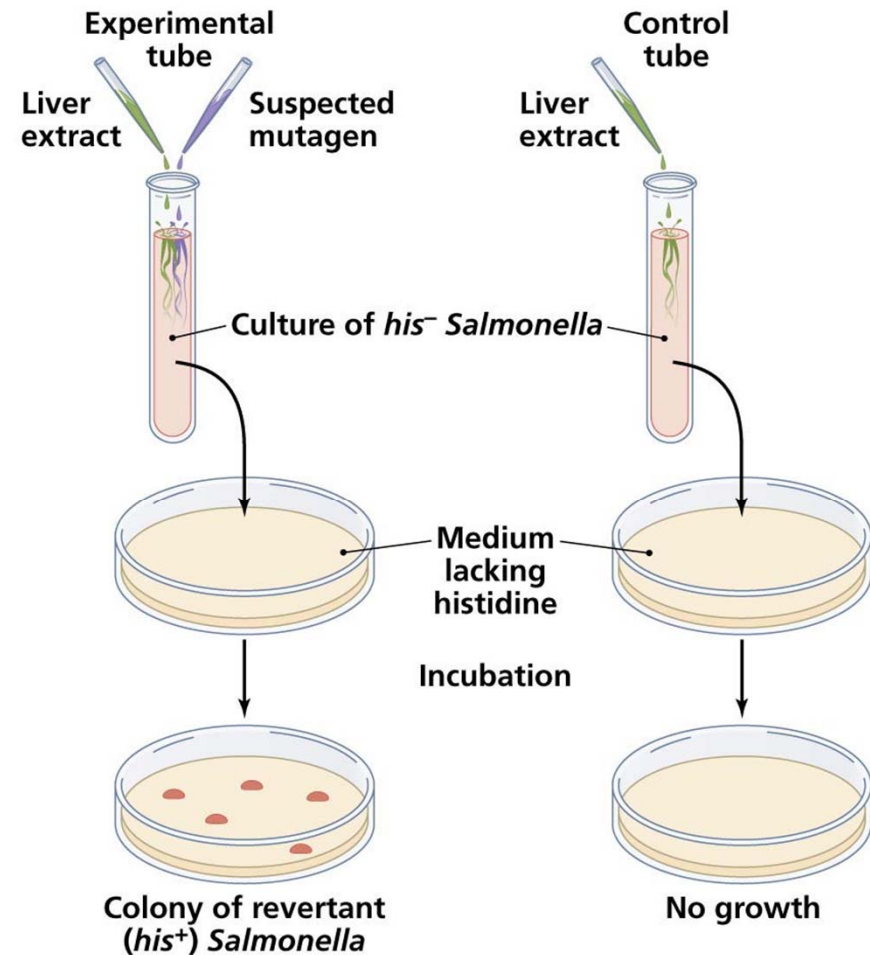
Bakteriální testy mutagenity:

- detekce bodových mutací;
- umožňují identifikovat mutagenní (a potenciálně karcinogenní) účinky komplexních směsí z životního prostředí;
- základní verze – tzv. Amesův test, ale existuje řada modifikací založených na podobném principu – např. SOS chromotest, UmuC test, Mutatox

Testy mutagenity/genotoxicity

Amesův test:

- test reverzních mutací využívající auxotrofní kmeny *Salmonella typhimurinum*, (např. TA-1531), které nejsou schopny růst v médiu, které neobsahuje histidin



Testy mutagenity/genotoxicity

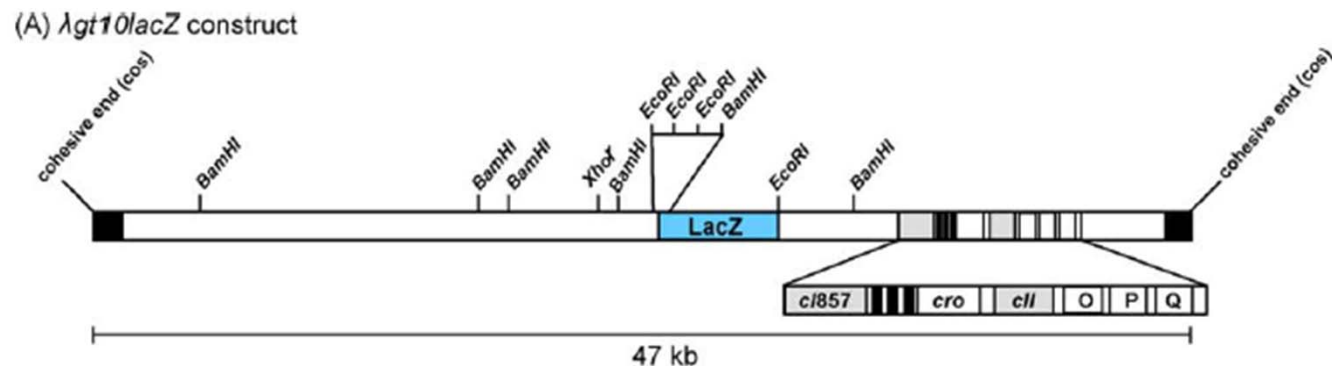
Testy mutagenity na vyšších rostlinách:

- detekce bodových mutací i poškození chromozómů;
- výhoda – lze provádět přímo detekci půdních mutagenů *in situ*;
- použitelné rostliny – *Vicia faba*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*

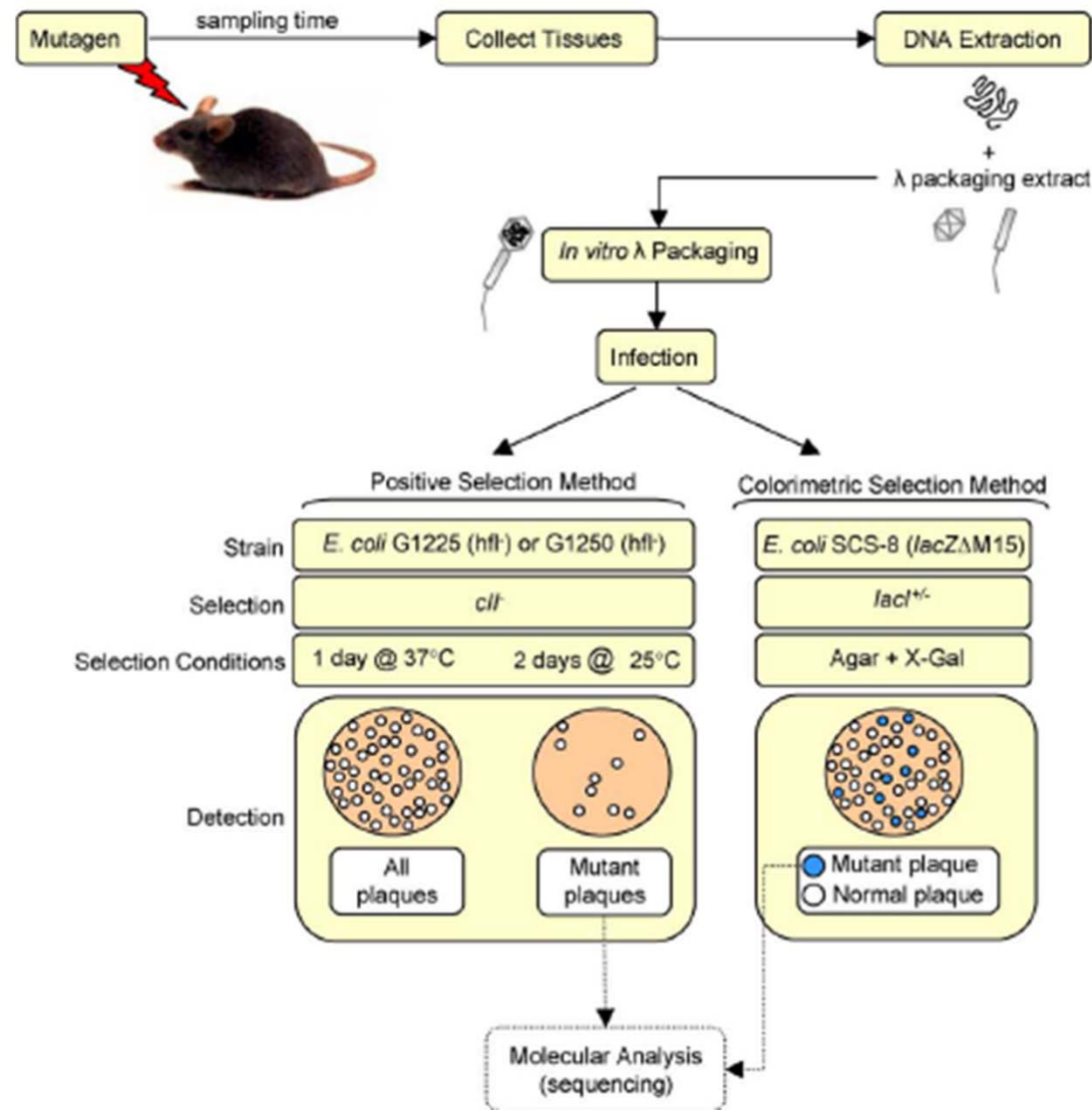
Testy mutagenity/genotoxicity

Testy mutagenity na transgenních hlodavcích:

- výhoda savčí metabolismus, tkáňově specifické mutageny/karcinogeny;
- nevýhoda – finanční a prostorová náročnost;
- více variant – BigBlue ® potkani a myši, Muta™ Mouse

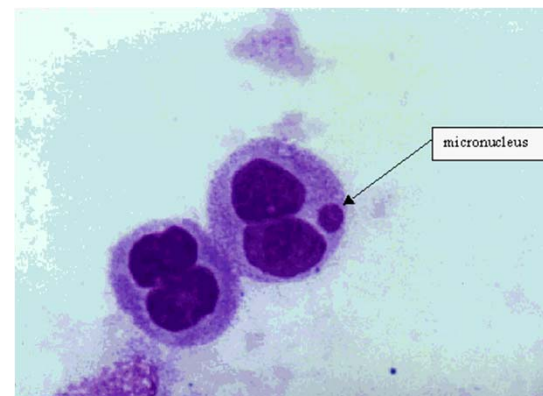
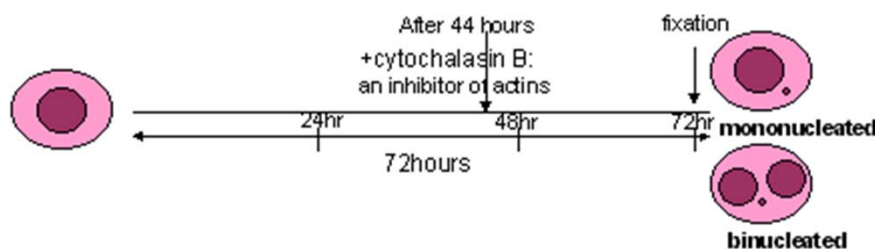


Testy mutagenity/genotoxicity

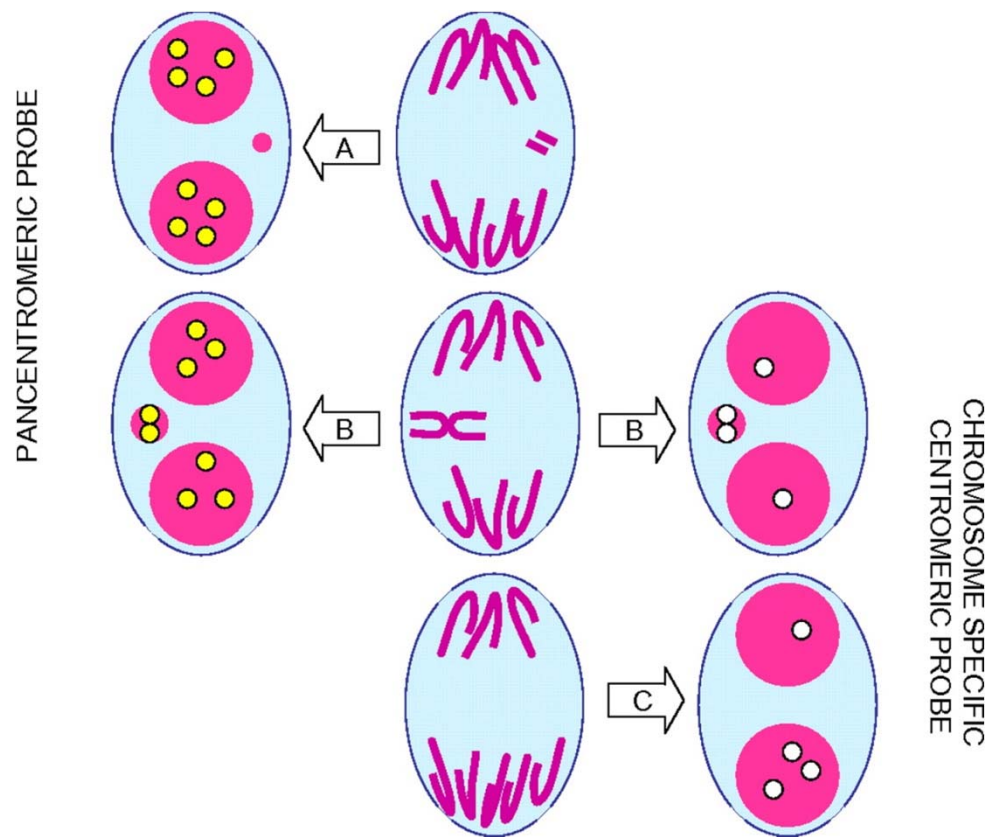


Detekce chromozomálních aberací - mikrojaderný test

- testy na buněčných kulturách *in vitro*, zpracování *in vivo* vzorků, vč. lidských tkání (např. izolované lymfocyty);
- mikrojádra vznikají v průběhu metafáze/anafáze;
- umožní stanovit jak ztrátu chromozómů, tak jejich zlomy a další parametry;



Detekce chromozomálních aberací - mikrojaderný test



Testy karcinogenity

Testy karcinogenity na hlodavcích:

- dlouhodobé (life-time) experimenty – potkan;
- většinou kombinovány s testy chronické toxicity – šetření zvířat;
- OECD Test Guideline 451: Carcinogenicity Studies;
- většina dat (National Toxicology Program, International Agency for Research on Cancer) je dostupná spíše pro jednotlivé látky;
- studie zahrnují jak podrobné analýzy vzniklých typů nádorů tak řadu dalších toxikologických dat – slouží jako podklad pro další publikace.

Testy karcinogenity

Krátkodobější testy karcinogenity na hlodavcích:

- iniciační-promoční protokol;
- je podána látka iniciační (DEN – diethylnitrosamine, DMBA – 7,12-dimethylbenz[a]anthracen) a následně jsou pravidelně aplikovány nádorové promotory (TPA apod.);
- je sledován vznik nádorů, hlavně v pokožce;

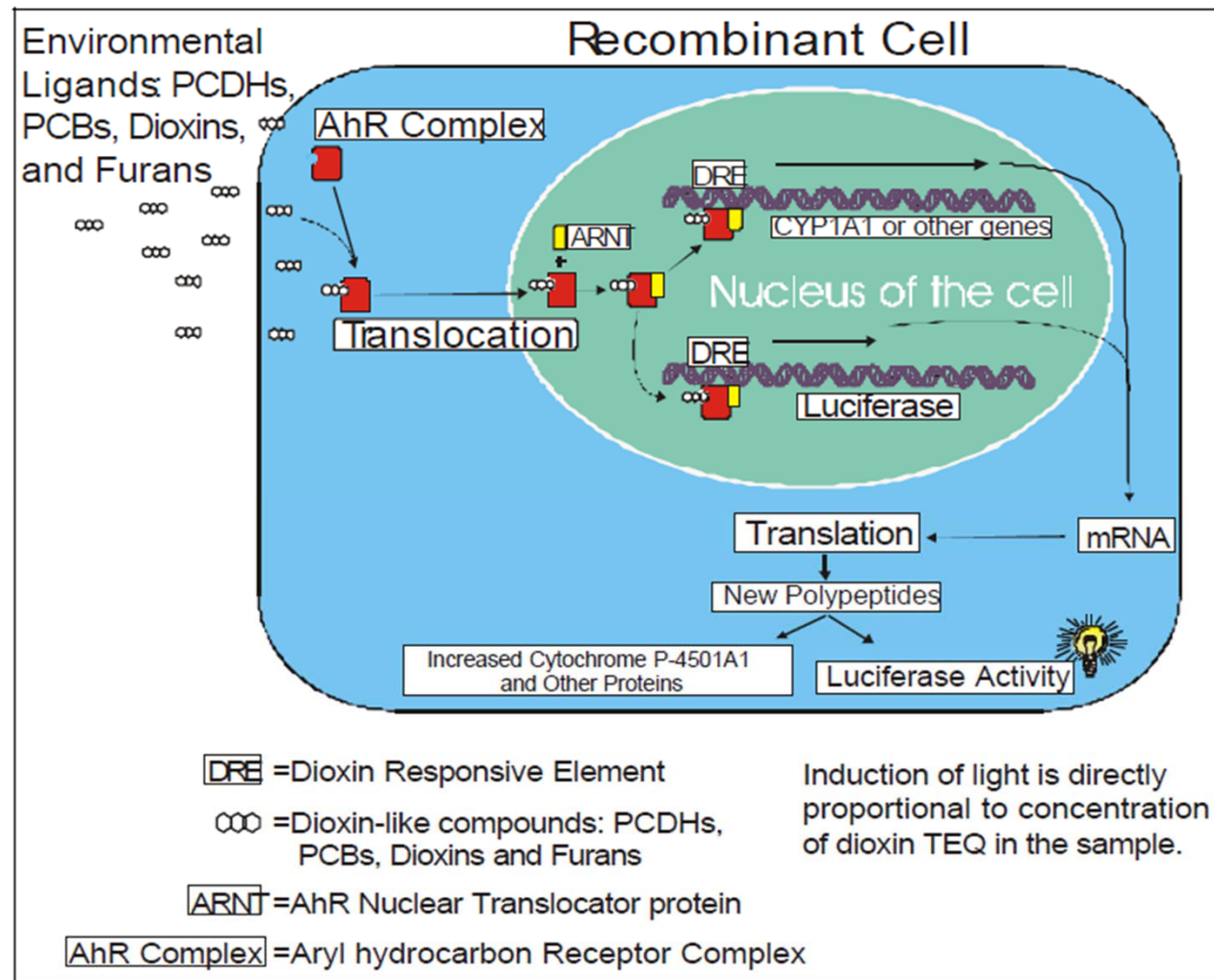
In vitro testy zaměřené na specifické mechanismy

V současné době je velká snaha nahradit některé testy specifických toxicit na laboratorních hlodavcích testy v *in vitro* podmínkách, které používají specifické buněčné modely:

- nespecifická akutní toxicita;
- orgánová a tkáňová toxicita;
- specifické testy zaměřené na definovaný mechanismus toxicity;
- všechny tyto testy jsou primárně určeny pro toxikanty potenciálně nebezpečné pro člověka, nebo jako analýza větších skupin látek s cílem vytvořit modely pro definování SAR a QSAR analýz;

Příklad specifického *in vitro* testu

Chemical Activated Luciferase gene eXpression - CALUX assays



Příklad specifického *in vitro* testu

Možnosti využití

- analýza nových průmyslových látek;
- fyziologické regulátory aktivity specifických receptorů;
- analýza komplexních environmentálních směsí;
- epidemiologické analýzy;
- náhrada drahých chemických analýz;
- náhrada *in vivo* testů?
- screening a monitoring?