

# NOVÝ BIOLOGICKÝ TEST S KVASINKAMI *S. cerevisiae* PRO RYCHLOU DETEKCI TOXICKÝCH LÁTEK VE VODĚ

**Ing. Jaroslava Doležalová, Ing. Lubomíra Rumlová, Ing. Karel Eminger**

Ústřední vojenská nemocnice - Vojenská fakultní nemocnice Praha,  
U Vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6, jaroslava.dolezalova@uvn.cz,  
lubomira.rumlova@uvn.cz, karel.eminger@uvn.cz

## Úvod

Biologické testy toxicity jsou významným prostředkem pro posouzení toxického znečištění vody. Umožňují komplexní hodnocení škodlivosti směsí různých znečišťujících látek, kterou není možné přesně popsat chemickou analýzou.

V současnosti existuje velké množství biotestů s vysokou vypovídací hodnotou. Nejčastěji jsou používány soubory testů používající jako testovací organismy sladkovodní ryby *Brachydanio rerio* (ČSN EN ISO 7346), perloočky *Daphnia magna* (ČSN EN ISO 6341) a sladkovodní řasy (ČSN EN ISO 8692). Standardní biotesty vyžadují poměrně dlouhý čas, potřebný k získání výsledků (24 až 96 hodin). Nejsou tedy vhodné v případě, kdy potřebujeme mít informace o toxicitě vody v reálném čase (ekologické havárie, sledování toxicity odpadních vod, kontrola zdrojů pitné vody). Pro uvedené biotesty je nutné průběžně množit testovací organismy a udržovat je v předepsaném fyziologickém stavu. Například u dafnií je pro testování předepsáno použití pouze samiček, které jsou mladší než 24 hodin.

Uvedené nedostatky nemá bakteriální bioluminiscenční test s bakteriemi *Vibrio fischeri* (ČSN EN ISO 11348). Test používá lyofilizované bakterie, které jsou dlouhodobě skladovatelné při teplotě -18 °C a jsou kdykoli použitelné k měření bez dlouhé přípravy. Doba potřebná k získání výsledků testu je velmi krátká – předepsaná expoziční doba je 15 až 30 minut. I zde však existuje několik omezujících faktorů, jako jsou rušivé vlivy pH, zbarvení a zakalení vzorků atd.

Pro posouzení toxicity vody je však vždy vhodné použít nikoli jediný test, ale soubor biotestů, které používají různé metody, různé testovací organismy a doplňují se ve spektru detekovaných látek a v indikační citlivosti.

Naším cílem bylo navrhnout a ověřit nové testy, které by rozšířily spektrum rychlých biologických testů toxicity a které by bylo možné použít i v polních podmínkách, například v mobilních laboratořích vojenské zdravotnické služby a veterinární služby Armády České republiky.

Jako testovací organismus jsme vybrali sušené instantní kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Tyto kvasinky splňují všechny požadavky kladené na testovací organismus: V uzavřených obalech z bariérové fólie jsou uchovatelné po dobu min. 18 měsíců při běžných skladovacích podmínkách. Po přidání vody okamžitě ožívají a jsou tak kdykoli k dispozici pro provedení testů. Jsou dostatečně citlivé vůči velkému množství toxických

látek. V průběhu řešení projektu obranného výzkumu TOXVODA jsme navrhli a ověřili několik nových rychlých biologických testů toxicity se sušenými kvasinkami. Jedním z nich je test konduktometrický, jehož popis a výsledky předkládáme v tomto příspěvku.

## **Materiál a metody**

Jako testovací organismus jsme použili sušené kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* – instantní pekařské droždí Saf-instant firmy Lesaffre (Francie).

Pro ověření testu bylo vybráno deset toxikantů. Mezi ně patří atropin (látka psychicky a fyzicky zneschopňující), fenitrothion (organofosfát se základní strukturou stejnou jako mají nervově paralytické látky) a kyanid draselný (látka všeobecně jedovatá – inhibitor dýchacího řetězce). Dalšími toxickými látkami byly akonitin (rostlinný toxin), chlorid rtuťnatý a dusičnan olovnatý (zástupci solí těžkých kovů), sulfid sodný (toxická a žíravá látka, nebezpečná pro vodní organizmy), oxid arsenitý (protoplazmatický jed), síran thallný (nervový jed teroristicky snadno zneužitelný) a fenol (fenoly z průmyslových odpadů jsou častým zdrojem znečištění přírodních vod).

Konduktometrický test je založen na sledování změn měrné vodivosti suspenze kvasinek. Po přidání kvasinek do 10% roztoku cukru ve vodě rychle nastupuje kvašení a měrná vodivost suspenze stoupá. V přítomnosti toxických látek je růst měrné vodivosti (v závislosti na druhu a koncentraci toxikantu) zpomalen.

Provedení testu: Do tří až pěti zkumavek se pipetuje po 20 ml zkoumané vody, přidají se 2 g cukru. Po rozpuštění se změří měrná vodivost cukerného roztoku. Stejným způsobem se připraví tři až pět zkumavek s roztokem cukru ve vodě, která neobsahuje toxické látky a změří se jejich měrná vodivost (kontrola).

Do každé zkumavky se přidá 1,0 g sušených kvasinek a dobře se promíchá. Po uplynutí expoziční doby se opět změří měrná vodivost suspenzí v jednotlivých zkumavkách. Vhodná teplota pro konduktometrický test se pohybuje od +20 ° C do +35 °C. Je bezpodmínečně nutné, aby po celou dobu zkoušky měla pokusná suspenze kvasinek stejnou teplotu jako suspenze kontrolní.

Aby byla eliminována rozdílná měrná vodivost zkoumaného vzorku vody a kontroly, provede se korekce změřených hodnot měrné vodivosti tak, že se od měrné vodivosti suspenze kvasinek odečte příslušná hodnota měrné vodivosti cukerného roztoku. Dále se spočítá průměrná hodnota takto korigované měrné vodivosti pokusné a kontrolní suspenze. Pokud se průměrná hodnota korigované měrné vodivosti pokusné suspenze bude lišit od průměrné korigované měrné vodivosti kontrolní suspenze o 10 nebo více procent, předpokládá se, že ve zkoumaném vzorku je přítomna látka toxická pro testovací organismus.

Hodnotu EC<sub>50</sub> jsme určili regresní analýzou jako koncentraci látky ve vodě, která při expozici 30 minut způsobila 50% změnu průměrné korigované měrné vodivosti ve srovnání s průměrnou korigovanou měrnou vodivostí kontroly. Nejnižší pozorovatelnou koncentraci (EC<sub>10</sub>) jsme stanovili jako koncentraci látky ve vodě, která při zvolené expozici způsobila 10% změnu průměrné korigované měrné vodivosti ve srovnání s průměrnou korigovanou měrnou vodivostí kontroly.

Původně jsme pracovali s expoziční dobou 1 hodina. V průběhu práce bylo zjištěno a potvrzeno, že výrazné rozdíly v měrné vodivosti pokusné a kontrolní suspenze kvasinek se dostávají velmi rychle a od 15. minuty jsou prakticky konstantní. Expoziční doba konduktometrického testu byla proto později stanovena na 30 minut.

## Výsledky

Nejnižší koncentrace dosud zkoumaných toxických látek prokazatelné konduktometrickým testem a hodnoty EC<sub>50</sub> jsou uvedeny v tab. 1. Pro srovnání jsou zde uvedeny také letální dávky těchto toxikantů pro člověka.

U fenitrothionu nebylo možné v důsledku jeho nízké rozpustnosti ve vodě hodnoty EC<sub>10</sub> a EC<sub>50</sub> stanovit.

**Tabulka 1. Hodnoty EC<sub>10</sub> a EC<sub>50</sub> pro konduktometrický test s kvasinkami *S. cerevisiae* v porovnání s letálními dávkami pro člověka**

Toxikant	EC <sub>10</sub> (mg.l <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> ** (mg.l <sup>-1</sup> )	Letální dávka pro člověka (mg)
<i>Akonitin</i>	14,7	38,7	5
<i>Atropin</i>	135	179,2	100
<i>Pb<sup>2+</sup></i>	8	558,1	1 000
<i>Fenol</i>	55	523,7	1 000
<i>Hg<sup>2+</sup></i>	15	110,1	500
<i>KCN</i>	12,5	42,4	200
<i>Oxid arsenitý</i>	16	187,2	150
<i>Síran thallný</i>	13	41,5	1 000
<i>Sulfid sodný</i>	10	79,8	10 000

## Diskuse a závěr

Kvasinky *S. cerevisiae* jsou velmi dobře prozkoumaným eukaryotickým organismem a jsou hojně využívány ke studiím genotoxicity různých látek. V literatuře jsme však našli pouze několik prací, jejichž autoři se zaměřili na využití těchto kvasinek jako testovacího organismu pro detekci toxických látek ve vodě, např. Weber [1, 2], Hrenovic [3], Esteve [4]. Popisované testy jsou založené na sledování změn fermentační aktivity kvasinek nebo inhibice jejich metabolické aktivity. Výsledky jsou k dispozici za více než 24 hodin a testy nejsou vhodné pro použití v polních podmínkách.

Test vhodný pro použití v polních podmínkách musí být proveden a vyhodnocen v co nejkratším čase a jeho provedení musí být nekomplikované a zvládnutelné na základě jednoduchého návodu. Laboratorní a instrumentální vybavení musí vyhovovat polním podmínkám. Test musí být k dispozici kdykoli, bez dlouhé přípravy testovacích organismů. Nejvhodnější jsou biologické objekty nacházející se v klidovém stavu, které jsou dlouhodobě skladovatelné a které se snadno a rychle ožíví po vložení do vodného

prostředí. A při tom všem musí test s dostatečnou citlivostí indikovat co nejširší spektrum toxických látek.

Konduktometrický test všechny uvedené požadavky splňuje. Je rychlý - výsledek je k dispozici za cca 60 minut. Provedení testu je jednoduché a zvládne ho zaškolený pracovník. Vybavení rovněž splňuje požadavky na testování vody v polních podmínkách. Požadavek na pohotovost testů byl splněn výběrem testovacího organismu. Sušené instantní kvasinky je možné skladovat za běžných podmínek po dobu 18 měsíců a nevyžadují žádnou přípravu před použitím k testování.

Konduktometrický test prokázal dostačující citlivost u sedmi z deseti dosud zkoušených toxikantů. Proto jsme vypracovali další dva testy s kvasinkami *S. cerevisiae*: letální test, který je založen na sledování změn počtu živých a mrtvých kvasinek v přítomnosti toxických látek a enzymatický test, který detekuje přítomnost toxikantů na základě sledování inhibice oxidoreduktáz. Tyto tři testy mají vůči dosud zkoušeným toxickým látkám rozdílnou citlivost, protože každý z nich zachycuje změny jiné fyziologické či metabolické aktivity buněk. Důležité je, že současné použití testů vedlo ke spolehlivé a dostatečně citlivé detekci všech dosud použitých toxikantů [5].

Konduktometrický test založený na sledování změn měrné vodivosti suspenze kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jako důsledku inhibice jejich fermentační aktivity v toxickém prostředí je zcela novou metodou, která může rozšířit možnosti detekce přítomnosti toxických látek ve vodě.

## Literatura

1. WEBER, J. - PLANTIKOW, A. - KREUTZMANN, J. A. New Bioassay with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on aquatic pollution. *Umweltwissenschaft und Schadstoff-Forschung*, 2000, vol. 12, no. 4, s. 185–189. ISSN: 0934-3504.
2. WEBER, J. - KREUTZMANN, J. - PLANTIKOW, A. - PFITZNER, S. - CLAUS, E. – MANZ, W. - HEININGER, P. A novel particle contact assay with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for ecotoxicological assessment of freshwater sediments. *Journal of Soils and Sediments*, 2006, vol. 6, no. 2, s. 84–91. ISSN: 1439-0108.
3. HRENOVIC, J. - STILINOVIC, B., - DVORACEK, L. Use of prokaryotic and eukaryotic biotests to assess toxicity of wastewater from pharmaceutical sources. *Acta Chimica Slovenica*, 2005, vol. 52, no. 2, s. 119–125. ISSN: 1318-0207.
4. ESTEVE, K. - POUPOT, C. - DABERT, P. - MIETON, M. - MILISIC, V. A. *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 36, no. 12, s. 1529–1534. ISSN 1367-5435.
5. RUMLOVÁ, L. – DOLEŽALOVÁ, J. A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, vol. 33, no. 3, s. 459 – 464. ISSN: 1382-6689.