STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Bakteriální degradace perzistentních látek

Shahin Monschizadeh Tehrany

Praha 2011

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 8. ochrana a tvorba životního prostředí

Bakteriální degradace perzistentních látek

Bacterial degradation of persistent substances

Autor: **Shahin Monschizadeh Tehrany**

Škola: **Gymnázium, Praha 2, Botičská 1**

Konzultanti: **prom. biol. Karel Novák, CSc.**
Mgr. Jan Čambal

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracoval samostatně, použil jsem pouze podklady (literaturu, SW atd.) uvedené v přiloženém seznamu a postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V …… dne …… podpis: ……

Poděkování.

Děkuji panu Karlu Novákovi za obětavou pomoc při mém výzkumu a sepisování celé práce. A dále panu Janu Čambalovi za podnětné připomínky.

Anotace

Práce byla zaměřena na sledování výskytu a schopnosti bakterií degradovat polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), které jsou významnou skupinou látek znečišťujících životní prostředí. Jako modelová látka byl zvolen pyren (benzo[def]fenantren), který není rozkládán běžnými mikroorganismy. Z míst, kde se dala předpokládat kontaminace látkami PAU, byly odebrány vzorky. Ty pak byly homogenizovány, extrahovány a vysety na misky se selektivní agarovou půdou, která obsahovala tenkou vrstvu pyrenu jako jediný zdroj organického uhlíku pro výživu mikroorganismů. Touto metodou bylo charakterizováno devět samostatných bakterií, nebo konsorcií, které byly v různé míře schopny degradovat pyren. Degradační aktivita byla ověřena spektrofotometricky, podle úbytku typické fluorescence pyrenu. Pro rychlý screening úbytku pyrenu na detekčních miskách byla vyvinuta metoda fluorescenční fotografie. Výrazná degradační aktivita vůči pyrenu byla nalezena u pěti bakteriálních společenstev, která rozkládají olejovou emailovou barvu, asfaltový dispersní nátěr, asfalt po narušení motorovým olejem, dehtovanou lepenku a opadlou kůru břízy (*Betula verrucosa*). Rovněž byla potvrzena vysoká stabilita a degradační schopnost u archivního vzorku bakteriální populace z komplexně kontaminované lokality po deseti letech skladování. Bylo provedeno částečné čištění a určení aktivních složek degradujících společenstev. Vysoké zastoupení bakterií degradujících pyren ve zkoumaných suspektních vzorcích prokazuje jejich větší rozšíření v prostředí, než by bylo možné předpokládat na základě literárních údajů. Jejich překvapivě hojný výskyt lze připsat kontaminaci životního prostředí v důsledku činnosti člověka. Nalezená bakteriální společenstva s vysokou aktivitou jsou zdrojem kmenů pro potenciální vývoj biotechnologických preparátů určených k dekontaminaci oblastí znečištěných PAU.

Klíčová slova: biodegradace; polycyklické aromatické uhlovodíky; PAU; pyren

Annotation

The work was focused on monitoring and the ability of bacteria to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). From places where we assumed the contamination by this substances were taken samples. Then they were homogenized and applied to agar plates with a thin layer of pyrene. By this method was discovered nine individual bacteria or consortia that are in varying degrees, able to degrade pyrene. At the same time a vertification of the degradation ability of a ten years stocked archival sample was made. This sample has the highest degree of degradation. The degradation activity was verified using spectrophotometry and fluorescence photos.

Key words: biodegradation; polycyclic aromatic hydrocarbons; PAH; pyrene

Obsah

Úvod 9
Typy rozkladu organických látek 9
Abiotické faktory 10
Biotické faktory 11
Bakteriální degradace podle skupin cílových látek 11
Polychlorované bifenyly 11
Polycyklické aromatické uhlovodíky 12
Bakteriální degradace podle druhů bakterií 13
Rod Pseudomonas 14
Rod Mycobacterium 15
Metodika 16
Použité pomůcky, přístroje a chemikálie 16
Pomůcky a přístroje 16
Chemikálie 16
Složení a příprava kultivačních médií 16
Metody a postupy 17
Odběr a skladování vzorků 17
Rozbor vzorků 18
Extrakce vzorků 18
Kvantitativní stanovení bakterií 18
Kvantitativní stanovení schopnosti degradovat pyren 18
Fluorescenční metody pro sledování degradace pyrenu 19
Výsledky a diskuse 21
Zastoupení bakterií ve vzorcích 21
Izolace a čištění bakterií schopných degradovat pyren 22
1. etapa 22
2. etapa 22
3. etapa 23
Použití fluorescenční fotografie pro nalezení degradátorů PAU 23
Spektrální změny při úbytku pyrenu 24
Závěr 27
Seznam literatury 28
Přílohy 30

Úvod

Práce byla zaměřena na sledování výskytu a schopnosti bakterií degradovat polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), které jsou významnou skupinou látek znečišťujících životní prostředí. Jako modelová látka byl zvolen pyren (benzo[def]fenantren), který není rozkládán běžnými mikroorganismy. Z míst, kde se dala předpokládat kontaminace látkami PAU, byly odebrány vzorky. Ty pak byly homogenizovány, extrahovány a vysety na misky se selektivní agarovou půdou, která obsahovala tenkou vrstvu pyrenu jako jediný zdroj organického uhlíku pro výživu mikroorganismů. Touto metodou bylo charakterizováno devět samostatných bakterií, nebo konsorcií, které byly v různé míře schopny degradovat pyren. Degradační aktivita byla ověřena spektrofotometricky, podle úbytku typické fluorescence pyrenu. Pro rychlý screening úbytku pyrenu na detekčních miskách byla vyvinuta metoda fluorescenční fotografie. Výrazná degradační aktivita vůči pyrenu byla nalezena u pěti bakteriálních společenstev, která rozkládají olejovou emailovou barvu, asfaltový dispersní nátěr, asfalt po narušení motorovým olejem, dehtovanou lepenku a opadlou kůru břízy (*Betula verrucosa*). Rovněž byla potvrzena vysoká stabilita a degradační schopnost u archivního vzorku bakteriální populace z komplexně kontaminované lokality po deseti letech skladování. Bylo provedeno částečné čištění a určení aktivních složek degradujících společenstev. Vysoké zastoupení bakterií degradujících pyren ve zkoumaných suspektních vzorcích prokazuje jejich větší rozšíření v prostředí, než by bylo možné předpokládat na základě literárních údajů. Jejich překvapivě hojný výskyt lze připsat kontaminaci životního prostředí v důsledku činnosti člověka. Nalezená bakteriální společenstva s vysokou aktivitou jsou zdrojem kmenů pro potenciální vývoj biotechnologických preparátů určených k dekontaminaci oblastí znečištěných PAU.

Typy rozkladu organických látek

Rozklad organických látek je jeden z nejdůležitějších faktorů, umožňujících život na Zemi. Podle obecného schématu se organické látky rozkládají na minerální látky, ty jsou pak znovu využity rostlinami. Ty je přemění na látky organické, které mohou být využity jinými živočichy, anebo se mohou znovu rozložit. Tento koloběh narušují perzistentní látky, neboli látky, které dokážou do určité míry odolávat přirozeným rozkladným procesům. Do přírodního prostředí se dostávají zejména činností člověka.

Ale i přes jejich perzistenci, se většina odolných organických látek časem rozloží a zmizí.

Abiotické faktory

Při rozkladu vlivem abiotických faktorů se jedná se o takové rozkladné procesy, kde nedochází k biochemickým reakcím. Za příklad, že i perzistentní a tedy i chemicky stabilnější látky mohou podléhat abiotickým rozkladům, uvádím polycyklické aromatické uhlovodíky *(PAU).* Tyto látky se podle molekulové hmotnosti dělí na nízkomolekulární a vysokomolekulární, přičemž vyšší molekulová hmotnost (vyšší počet kondenzovaných jader) je spojena s vyšší stabilitou v prostředí.

Vodní prostředí

Z vodního prostředí se nízkomolekulární PAU nejčastěji uvolňují těkáním. Stabilnější PAU s vyšší molekulovou hmotností procesu těkání nepodléhají. Jejich odstranění z vodního prostředí může probíhat příjmem vegetací. V sedimentech se PAU, vzhledem k nedostatku kyslíku a slunečního záření, rozkládají pomaleji. Dochází zde tedy k jejich akumulaci. Odtud jsou přijímány organismy žijícími na dně.(1)

Ovzduší

Do ovzduší se PAU dostávají procesem nedokonalého spalování. Jsou primárně tvořeny v plynné fázi, odkud se v průběhu kondenzace sorbují na tuhé částice. Tímto způsobem jsou schopny přenosu na velmi vzdálená místa. Při svém transportu často podléhají fotooxidaci.(1)(2)

Půda

Odstraňování PAU z půdy do značné míry závisí na jejích vlastnostech, neboť se PAU sorbují na její částice. Adsorpce dobře koreluje s obsahem organické hmoty, na kterou se sorbují hydrofobní látky. Odstraňování PAU z půdy probíhá mnoha způsoby:

- těkáním – u nízkomolekulárních PAU
- fotooxidací – závisí na množství slunečního záření
- vymýváním – závisí na rozpustnosti PAU
- příjmem vegetací (1)

Biotické faktory

Jsou zodpovědné za takové rozkladné procesy, kde jsou organické látky rozkládány organismy. Nejčastěji to bývají bakterie, houby a řasy.(2) Předložená práce byla zaměřena na degradační schopnosti bakterií, neboť jsou celkově aktivnější než ostatní mikroorganismy a mohou rozkládat širší spektrum látek. Schopnost degradovat perzistentní látky je u bakterií často uložena v plazmidech. Je to spojeno s tím, že schopnost rozkládat a tudíž i využívat určitou látku je jen adaptací na okolní prostředí a není to proto nepostradatelná vlastnost pro přežití bakterie. Případná ztráta plazmidů, ke které dochází poměrně často, potom nemusí pro bakterii znamenat smrt. Na druhou stranu možnost šíření degradační schopnosti v populaci bakterií spolu s přenášeným plazmidem dovoluje rychle využít nový zdroj organických látek.

Bakteriální degradace podle skupin cílových látek

Skupina látek nazývaná těžkorozložitelné organické látky obsahuje několik podskupin, z nichž nejvýznamnější a nejčastěji studované jsou polychlorované bifenyly a polycyklické aromatické uhlovodíky.

Polychlorované bifenyly

Jednou z těchto podskupin jsou PCB neboli polychlorované bifenyly. Jsou to látky, které mají na svém bifenylovém jádře jeden až deset atomů chloru. Podle stupně chlorace jsou bezbarvé až žluté. Méně chlorované PCB jsou kapaliny. Více chlorované PCB jsou pevné látky. PCB jsou látky hydrofobní, jsou velmi odolné vůči účinkům kyselin a zásad, nepodléhají oxidaci běžnými oxidačními činidly a jsou téměř rezistentní vůči hydrolýze a alkoholýze.(3) Mimo tyto vlastnosti k širokému použití PCB přispěly jejich elektroizolační vlastnosti, výborná tepelná vodivost, chemická inertnost, nízká vznětlivost a hořlavost. PCB byly celosvětově vyráběny od 30. let do poloviny 80. let 20. století a používaly se jako chladící kapaliny v transformátorech, teplonosná media, ohnivzdorné a teplonosné antikorozní hydraulické kapaliny v důlních zařízeních a vakuových pumpách.(4)

Degradace PCB byla popsána u bakteriálních kmenů: *Alcaligenes Y42; Acinetobacter P6 a Pseudomonas* sp. *LB400*. Obecně platí, že:

- biodegradabilita klesá se stoupajícím stupněm chlorace
- kongenery s nesubstituovaným kruhem jsou obecně transformovány rychleji než kongenery se substitucí na obou kruzích
- iniciační oxidace obvykle probíhá na méně substituovaném kruhu
- iniciační krok k transformaci PCB zajišťují enzymy: *bifenyl-2,3-dioxygenasa* a v případě bakteriálních kmenů *Alcaligenes eutrophus H850* a *Pseudomonas* sp. *LB400* osahují i enzym bifenyl-3,4-dioxygenasa

O možnosti biodegradace PCB rozhoduje hlavně uspořádání atomů chloru. Je například známo, že tetra-a pentachlorbifenyly jsou transformovány mnohem snadněji, když je jeden z kruhů substituován v polohách 2 a 3, anebo že dva atomy chloru v polohách 2,6- a 2,2'- zvyšují rezistenci k biotransformaci.(3)

Polycyklické aromatické uhlovodíky

Skupina PAU (mezinárodní zkratka PAH je odvozena od „Polycyclic Aromatic Hydrocarbons") také patří do těžkorozložitelných organických látek. Jedná se o látky, které mají ve své struktuře dvě a více kondenzovaných benzenových jader. Za normálních podmínek to jsou pevné látky a jejich vlastnosti přímo závisí na struktuře molekuly. Se vzrůstající molekulovou hmotností vzrůstá bod tání, bod varu, lipofilita a klesá rozpustnost ve vodě. (1)

Rozpustnost PAU

Rozpustnost ve vodě hraje důležitou roli pro dostupnost PAU pro mikroorganismy. Obecně platí, že rozpustnost PAU ovlivňuje obsah solí a organických látek ve vodě. Například v odpadních vodách se může rozpustnost některých PAU zvýšit až řádově. Naopak v mořské vodě, je v důsledku obsahu anorganických solí jejich rozpustnost nižší. Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím rozpustnost ve vodě je teplota. Rozpustnost *anthracenu* se při změně teploty z 5°C na 30°C zvýší pětinásobně. Dále se dá říct, že rozpustnost ve vodě a degradabilita je nepřímo úměrná počtu aromatických kruhu v struktuře.(2)(1)

Adsorbce PAU

Adsorpce je dalším důležitým faktorem ovlivňujícím jejich degradabilitu. Adsorpce způsobuje, že se molekuly PAU fyzikálně navážou na okolní prostředí a znemožní tak degradátorům se k nim dostat. PAU se mohou tímto způsobem sorbovat například na zrnka písku, který se pak stává jakýmsi rezervoárem. Adsorpce na pevné látky je u jednotlivých PAU nepřímo úměrná jejích parciálnímu tlaku par. To znamená, že čím je látka těkavější, tím je nižší adsorbce.(2)(1)

Struktura a perzistence PAU

Struktura přímo souvisí s reaktivitou a tedy i s perzistencí PAU. Jak bylo výše uvedeno, tak se PAU skládají ze dvou a více kondenzovaných benzenových jader. Tyto jádra mohou být v: lineárním (například *tetracen* obrázek 1a), angulárním (například *chrysen* obrázek 1b)nebo klastrovaném (například *pyren* obrázek 1c) seskupení. Reaktivita závisí na počtu a seskupení těchto jader. V lineárně anelovaném uspořádání jsou tyto látky nejméně stabilní. Jejich stabilita rose ke klastrovanému uspořádání a nejvyšší je u angulárního. Kromě uspořádání aromatických jader, se dají PAU dělit na:

- nízkomolekulární s molekulovou hmotností: 152–178 g/mol.
- Středněmolekulární s molekulovou hmotností: 202 g/mol .
- Vysokomolekulární molekulovou hmotností: 228–276 g/mol .

Nízkomolekulární PAU jsou degradovány velkou skupinou organismů, naopak vysokomolekulární PAU jsou díky své struktuře degradovány menším počtem mikroorganismů.(1) dále se dá říci, že rychlost degradace je nepřímo úměrná počtu aromatických kruhů. (5)

Bakteriální degradace podle druhů bakterií

Kromě hub, řas a dalších skupin organismů mohou perzistentní látky velmi účinně degradovat bakterie. Výhoda v bakteriální degradaci perzistentních látek je především v spektru látek, které dokážou bakterie metabolizovat. Další významnou výhodou je rychlost degradace.

Bakteriální schopnost degradace PAU a PCB byla dokázána u mnoha druhů bakterií. Mezi nejúčinnější degradátory PAU patří rody: *Pseudomonas;*

Mycobacterium;Rhodococcus; Sphingomonas.(1);(6);(7); (5) Substrátová specifita publikovaných degradátorů je uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1. Substrátová specifita známých bakterií rozkládajících polycyklické aromatické uhlovodíky

Bakterie	**Substrátová specifita (rozkládané látky)**	**pramen**
Pseudomonas putida, P. aeruginosa, P. paucimobilis,P. fluorescens,P. stutzeri, Pseudomonas sp.	fenantren; anthracen; fluoranthen; fluoren; naftalen	(8)(1)
Rhodococcus sp.	pyren; fenanthren; anthracen; fluoranthen; chrysen;	(1)(9)
Flavobacterium sp.	fluoranthen; anthracen	(1)
Sphingomonas paucimobilis	pyren; fluoranthen; chrysen; benzo(a)pyren; benzo(a)antracen; naftalen; fenantren; antracen	(1)(10)
Mycobacterium sp.	pyren; fenantren; fluoranten; naftalen; antracen	(1)(11)

Bakteriální rody degradující PCB jsou například: *Alcaligenes; Pseudomonas; Acinetobacter; Corynebacterium*. (3)

Rod Pseudomonas

Bakterie rodu *Pseudomonas* jsou Gram-negativní, chemoorganotrofní, tyčinky. Pohybují se polárně orientovanými bičíky. Rostou v rozmezí 0-42 °C. Teplotní optimum je 35 °C. (12) Tento rod patří k degradátorům s nejširším spektrem substrátové specifity. M. Bouchez a kol. u tohoto rodu uvádí bakterie, které jsou schopny růst na naftalenu, fluorenu a fenantrenu jako na jediném zdroji uhlíku.(9)

Rod Mycobacterium

Bakterie rodu *Mycobacterium* patří k nejúčinnějším degradátorům PAU. Jsou schopny degradovat široké spektrum těchto látek. Mimo nízkomolekulárních PAU jako jsou například *fenantren*, *anthracen*, jsou schopny degradovat některé vyšší PAU jako pyren, fluoranten, benzo[a]pyren. C. E. Cergnilia a Ingrid Kelley uvádí bakterii *Mycobacterium* sp. se schopností mineralizovat 95% fluorantenu za 24 hodin. (6) Do tohoto rodu patří i bakterie *Mycobacterium vanbaaleni PYR-1*, objevena již zmíněným Cergniliou. Tato bakterie patří k prvním objeveným a nejúčinnějším rozkradačům PAU (zejména pyrenu). Je schopna rozkládat bifenyl, naftalen, anthracen, fluoranten, 1-nitropyren, pyren, fenanthren, benzo[a]pyren, benz[a]anthracen, 7,12-dimethylbenz[a]anthracen. (13); (5); (13) Další bakterii se schopností utilizovat široké spektrum PAU popsali E. Karabika a kol. Jedná se o *Mycobacterium* sp. *SPYR1*. Tato Gram-pozitivní bakterie je schopna využít pyren, fluoranten, fluoren, anthracen a acenaften jako jediný zdroj uhlíku a energie.(14)

Metodika

Použité pomůcky, přístroje a chemikálie

Pomůcky a přístroje

parní autokláv; chlazená fluorescenční kamera- Diana 2 (výrobce: Raytest, Straubenhardt, SRN); RF-540 (výrobce Shimadzu, Kjóto, Japonsko), horkovzdušný sterilizátor; termostat (na 25°C); laboratorní váhy; automatické pipety a plastové špičky; Petriho misky (skleněné a polystyrenové); mikrozkumavky Eppendorf 1,5 ml; Erlenmeyerovy baňky 100 ml; autoklávovatelné láhve na zásobní roztoky- sérovky; mikrobiologické kličky; skleněné stěrky na roztírání výsevů na agarových půdách („hokejky“); alobal; porcelánová třecí miska

Chemikálie

Pyren; aceton; etanol; složky mikrobiologických půd viz níže

Složení a příprava kultivačních médií

Thorntonova půda:

KNO_3 ..... 0,5 g/l
K_2HPO_4 ..... 1,0 g/l
$MgSO_4$ ..... 0,2 g/l
NaCl ..... 0,1 g/l
$FeCl_3$ ..... 0,002 g/l
$CaCl_2$ ..... 0,2 g/l
Asparagin ..... 0,5 g/l
Manit ..... 1,0 g/l (1)

Minerální médium podle Kästnera

Na_2HPO_4.....2,13 g/l
$MgSO_4$ .....0,2 g/l

NH_4Cl ..... 0,5 g/l
stopové prvky ..... 1,0 ml/l
agar ..... 16,0 g/l

poznámka: pH se nemusí upravovat

Po autoklávování při 120°C po dobu 20 minut byly půdy zchlazeny na vodní lázni na 55°C a nalévány do Petriho misek po 20 ml. Po zatuhnutí agaru a označení byly misky dosušeny při pokojové teplotě tři dny a do použití skladovány při 4°C v PE sáčcích.

V případě minerální půdy podle Kästnera byl vytvořen film pyrenu rozetřením 1 ml 0,02% pyrenového roztoku v acetonu (4 mg/ml) pomocí zahnuté skleněné tyčinky po celé ploše agarové plotny. Pyren se vyloučí ve formě drobných krystalků v důsledku prudkého poklesu rozpustnosti po smísení acetonu s vodou z povrchové vrstvy agarové půdy.

Metody a postupy

Odběr a skladování vzorků

Odběr půdních a jiných vzorků byl prováděn asepticky sterilní lžičkou a pinzetou. Pomůcky byly v terénu sterilizovány plamenem. Vzorky byly odebrány 30. ledna z míst, kde bylo možné předpokládat výskyt polycyklických aromatických uhlovodíků, či jiných vysokomolekulárních nepolárních látek. Všechna odběrová místa se nacházela na otevřených plochách v areálu biologických ústavů AV ČR v Praze 4 - Krč (obr. 2). Bylo nasbíráno celkem 9 vzorků:

1. Drť asfaltové směsi z okraje vozovky
2. Opadaná březová kůra (*Betula verrucosa* Ehr.)
3. Zvětralý nátěr na železném plotě, předpokládá se olejový email pro venkovní použití
4. Sediment dešťové vody stékající z parkovací plochy
5. Dřevěné piliny s možnou kontaminací uhlovodíky z parkovací plochy
6. Zvětralá dřevotřísková deska
7. Sražený dispersní asfaltový nátěr

8. Asfalt z vozovky narušený motorovým olejem
9. Dehtovaná lepenka

Všechny materiály byly v místech odběru dlouhodobě vystaveny povětrnostním vlivům, tudíž bylo možné předpokládat probíhající biologickou degradaci. Odebrané vzorky byly skladovány ve dvou vrstvách sterilních polypropylenových sáčků při 4°C ve tmě. Jako pozitivní kontrola byl použit, archivní vzorek z komplexně kontaminované lokality, který byl 10 let uchovávaný za uvedených podmínek. U bakteriální populace z tohoto vzorku byla již dříve prokázána mimořádně vysoká degradační aktivita.

Rozbor vzorků

Extrakce vzorků

Ze vzorků po dvouměsíčním skladování byla sterilně odebrána navážka 5 g (případně méně dle množství vzorku). Pevné vzorky byly homogenizovány ve sterilní misce. Mikroorganismy byly uvolněny energickým promícháním do desetinásobného množství sterilní destilované vody. Z této suspenze byla v mikrozkumavkách připravena řada dekadických ředění až do 10^{-6}. Dekadická ředění byla prováděna na ledové lázni, aby se zabránilo poklesu četnosti životaschopných bakterií.

Kvantitativní stanovení bakterií

Z ředění extraktů 10^{-2}, 10^{-4} a 10^{-6} bylo nanášeno 100 µl na misky s Thorntonovou půdou. Po rozetření byly misky inkubovány v obrácené poloze při 25 °C po dobu 5 dnů, kdy byl vizuálně zjištěn počet bakteriálních kolonií.

Kvantitativní stanovení schopnosti degradovat pyren

Z extraktů ředěných 10^{0}, 10^{-1} a 10^{-2} bylo nanášeno 100 µl na misky s filmem pyrenu. Kultivace probíhala při pokojové teplotě. Výsledky byly stanoveny po 14 a 28 dnech. Kolonie s degradační aktivitou byly hodnoceny buď podle výrazného nárůstu biomasy, nebo podle tvorby vyjasněných zón, tzv. lytických zón. Lytické zóny jsou projevem vymizení mléčného zákalu PAU v okolí bakteriální kolonie. Druhou možností je sledovat pokles fluorescence pyrenu pod UV osvětlením (1). Degradační aktivita byla hodnocena arbitrárně podle rozsahu lýze pyrenu na miskách známkou od 0 do 3.

- 0..... bez aktivity degradace pyrenu
- 1..... náznak aktivity degradace pyrenu
- 2..... střední aktivita degradace pyrenu
- 3..... silná aktivita degradace pyrenu

Varianty, jejichž opakování vykazovala degradační aktivitu přes 2,5, byly zvoleny pro přípravu čistých kultur s vysokou degradační aktivitou ve druhé fázi čištění degradátorů. Za tímto účelem byl z dobře definovaných lytických zón proveden stěr sterilní pipetovací špičkou. Ze stěrů byla připravena suspenze a její dekadická ředění podle postupu uvedeného výše. Z ředěných suspenzí byly opět provedeny výsevy na pevné selektivní médium s vrstvou pyrenu tak, aby došlo k tvorbě jednotlivých bakteriálních kolonií, resp. lytických zón. Výchozím předpokladem byl odhad 10^6 bakterií, které přibližně ulpí na plastové špičce. Počet a typ lytických zón a kolonií byly stanoveny po 14 a opakovaně po 28 dnech inkubace.

Ve třetí fázi izolace degradátorů bylo prováděno rozočkování mikrobiologickou kličkou, případně sterilními pipetovacími špičkami, z dobře definovaných lytických zón přímo na selektivní půdu s pyrenem a souběžně na úplnou bakteriologickou půdu podle Thorntona. Případné další čištění a kontrola na přítomnost kontaminací byly prováděny pomoci roztěrů na miskách.

Fluorescenční metody pro sledování degradace pyrenu

Na prokázání úbytku pyrenu byly použity dvě metody, které byly založeny na typické fluorescenci pyrenu při ozáření ultrafialovým světlem.

Spektrofotometrický průkaz degradace pyrenu

Mizení pyrenu z detekčních misek v důsledku jeho rozkladu bylo prokazováno pomocí fluorescenční spektroskopie. Vyříznuté bločky agaru včetně povrchové vrstvy byly přeneseny do UV-transparentních křemíkových kyvet o objemu 1 ml a důkladně homogenizovány pomocí plastové pipetovací špičky. Fluorescenční spektra homogenizovaného média byla zapisována pomocí fluorescenčního spektrofotometru RF-540.

Fluorescenční fotografie detekčních misek

Mizení vrstvy pyrenu na miskách s minimální půdou bylo sledováno nejenom podle snížení rozptylu světla při rozpouštění krystalků (jako projasnění zón), ale byla i využívána silná fluorescence pyrenu po ozáření ultrafialovým světlem. Pro tento účel byla navržena a ověřena detekce pomocí vysoce citlivé fluorescenční kamery.

Odkryté misky byly umístěny na pevnou tmavou podložku a nejdříve fotografovány kamerou Diana II v rovnoměrném světle dvou 15 W žárovek dopadajícím pod úhlem asi 45°. Následně byla kamera přepnuta do fluorescenčního režimu a miska byla osvětlena párem rtuťových výbojek s přibližně stejným umístěním jako zdroj viditelného světla. Viditelná část (zhruba nad vlnovou délku 400 nm) a dlouhovlnná UV část světla výbojek byly odstraněny pomocí UV-transparentního filtru s širokým pásmem kolem 256 nm. Fluorescence byla snímána přes pevně zabudovaný červený optický filtr používaný pro filtrování fluorescence laboratorního fluorescenčního barviva ethidium bromidu (propustnost přibližně 540–630 nm).

Získané digitální soubory byly následně zpracovány pomocí programu ImageJ (15). Záběry odpovídající odrazivosti a fluorescenci povrchu agarových půd byly obarveny falešnými barvami červenou a modrou a spojeny do kompozitních barevných snímků. Intenzita a kontrast barevných kanálů byly upraveny pro odlišení ploch s různou mírou degradace pyrenu.

Výsledky a diskuse

Zastoupení bakterií ve vzorcích

Z kvantitativního stanovení kolonií všech bakterií (tabulka 2.) celkově vyplývá, že i v zdánlivě nepříznivém prostředí se nachází velké množství bakterií. Tento poznatek nasvědčuje tomu, že se bakterie dokážou s kontaminací polycyklickými aromatickými uhlovodíky a jinými organickými látkami vyrovnat. Je u nich tedy obsažena schopnost tyto látky buď metabolizovat, nebo detoxifikovat. Nejnápadnější je tento jev u vzorku č. 8 (Olej+rozleptaný asfalt). U tohoto vzorku bylo prokázáno největší množství bakterií z celého měření. Nejmenší množství bakterií se nacházelo u vzorku č. 10 (Archivní vzorek). Toto relativně nízké číslo lze vysvětlit desetiletým skladováním tohoto vzorku.

Tabulka 2. Celkové počty bakterií ve vzorcích při stanovení na komplexní bakteriologické půdy podle Thorntona.

Číslo vzorku	Typ vzorku	počet kolonií (ředění 10^{-2})	počet kolonií (ředění 10^{-4})	hmotnost vzorku (g)	Platí (KTJ/g)*
1	asfaltová drť	400	0	5	4,E+06
2	březová kůra (bříza bělokorá)	nepočitatelné	640	5	6,E+08
3	olejový nátěr na železném plotě	100	9	0,18	5,E+06
4	bláto z parkoviště	nepočitatelné	11	5	1,E+07
5	piliny u parkoviště	300	3	5	3,E+06
6	dřevotříska	nepočitatelné	11	5	1,E+07
7	asfaltová suspenze	nepočitatelné	400	5	4,E+08
8	olej+rozleptaný asfalt	nepočitatelné	800	5	8,E+08
9	dehtovaná lepenka	nepočitatelné	400	5	4,E+08
10	archivní vzorek	17	1	3	2,E+05

* KTJ je zkratka pro „kolonie tvořící jednotky“

Izolace a čištění bakterií schopných degradovat pyren

1. etapa

Téměř u všech přírodních vzorků byla v hrubých extraktech prokázána aktivita už 2. týden po zahájení kultivace (obr. 3). Jedinou výjimkou byl vzorek č. 2, kůra z břízy bělokoré. Nejvyšší aktivita byla pozorována u vzorku č. 10 (archivní vzorek). Dále byla prokázána výrazná aktivita u vzorku č. 7 (asfaltový dispersní nátěr) a 8 (olej + rozleptaný asfalt).

Po 4 týdnech proběhlo další hodnocení, které je rovněž zaneseno v grafu (obr. 4). Opakovaný odečet potvrdil vysokou aktivitu vzorků 7, 8 a 10 a rovněž ukázal, že prakticky všechny vzorky obsahovaly degradátory pyrenu, i když existovaly velké rozdíly v rychlosti rozkladu. Nejméně aktivní byla populace z asfaltové drti, dřevotřísky a smyv z parkoviště. Na druhou stranu překvapivá aktivita byla nalezena i ve vzorku č. 2 čistě přírodního původu (březová kůra), i když zde nelze přítomnost aromatických uhlovodíků předpokládat.

Dále je patrné, že největší aktivita se vyskytovala u nejvyšších ředění. Tento jev je zřejmě způsoben přílišným rozrůstání hub, které inhibují růst bakteriálních kolonií. Větší ředění tedy neobsahuje tak velké množství houbových spor, aby houbové kolonie výrazněji inhibovaly růst bakteriálních kolonií. Tento jev také způsobil chybějící či vybočující údaje ve variantách nejspíše může za drobné odchylky ve vzorcích č. $1/10^0$ (asfaltová drť), $6/10^0$ (dřevotříska v rozkladu),$7/10^0$ (asfaltová suspenze), $7/10^{-1}$ (asfaltová suspenze), 9/100 (dehtová lepenka) a $10/10^0$. V těchto případech se na Petriho misce vytvořil souvislý povlak hub, který ztížil hledání lytických zón. Přirozená fluorescence hub také znemožnila hledání lytických zón pomoci UV světla

2. etapa

Již druhá etapa čištění vedla k důležitým závěrům ohledně povahy degradujících mikroorganismů. Ředění stěrů z lytických zón prvního výsevu dovolilo zbavit se ve většině případů houbových kontaminací, nicméně degradační aktivita se přenesla do nových kultur a její hodnota podle arbitrární stupnice korelovala s aktivitou

v primárních výsevech (výsledky nejsou prezentovány). Tudíž lze předpokládat, že pozorovaná degradační aktivita je mikrobiologického původu a je spojena s bakteriálními kmeny či společenstvy.

3. etapa

Třetí etapa čištění, tj. odočkování jednokoloniových izolátů, byla překvapivě neúspěšná. Tento jev lze prozatímně vysvětlit předpokladem, že účinný kmen je omezen na mikrokolonii ve středu každé lytické zóny a při použití plastové špičky pro přenesení není většinou zachycen. Předpokládané centrální mikrokolonie se ale nepodařilo zachytit ani pomocí binokulární lupy. Toto pozorování je ale v souladu s dřívější prací zaměřenou na izolaci aktivních degradátorů pyrenu (Tuháčková, 2000;(1)).

I přes výše uvedený problém se podařilo izolovat předpokládaný účinný kmen ze vzorku č. 7 (olej + asfalt) a rovněž je k dispozici izolát aktivního kmene z archivního vzorku č. 10, předběžně určený jako *Mycobacterium* sp. (Tuháčková, 2000; (1)). Jejich další charakterizace by měla přispět ke znalostem bakteriální degradace PAU a vzhledem ke zjištěným vysokým aktivitám je možné i jejich biotechnologické využití.

Centrální lokalizace předpokládaných mikrokolonií v lytických zónách vede k závěru, že k rozpouštění pyrenových krystalů není potřeba přímý kontakt s bakteriálními buňkami. K úbytku krystalů může docházet distančně působením účinných látek bakteriálního původu a případně i enzymů, které difundují do okolí kolonií. Tento předpoklad je v souladu s publikovanými údaji o tvorbě tzv. biosurfaktantů (povrchově aktivních látek) u řady známých kmenů degradátorů.

Použití fluorescenční fotografie pro nalezení degradátorů PAU

Vizuální hodnocení úbytku pyrenu v naočkovaných miskách na základě mizení zákalu (projasňování plaků) bylo podpořeno pomocí fluorescenční fotografie (obr. 5). Pyren, zobrazený jako modrý signál, v negativních kontrolách, či při naočkování neaktivní populací mikroorganismů přetrvával ve formě souvislého filmu obsahujícího větší krystalky (obr. 5A). Na druhé straně aktivní populace vytvářely nepravidelné lytické zóny, kde modrý signál pyrenu chyběl (obr. 5 B–D).

U struktur, které odrážely světlo, ale neměly vlastní fluorescenci, převládá červená barva. Jedná se zejména o bakteriální kolonie. Na obr. 5 B–D jsou označeny šipkami. V každém případě dovoluje fluorescenční metoda odlišit nečistoty či růst kolonií mikroorganismů od rozptylu způsobeného filmem pyrenu. Tyto případy bývá těžké odlišit i při použití binokulární lupy s vysokým zvětšením. Je třeba zdůraznit, že místa výskytu viditelných bakteriálních kolonií v zásadě nijak neodpovídala rozsahu lytických zón. Toto pozorování lze vysvětlit jako růst vlastních degradátorů ve formě biofilmu či mikrokolonií. V obou případech by tyto struktury nebyly makroskopicky pozorovatelné ve viditelném světle. Rozlišení mezi těmito možnostmi poskytuje třetí fáze čištění degradátorů. Protože pokusy odočkovat degradátory z oblasti lytických zón byly ve většině případů neúspěšné, je třeba předpokládat výskyt omezených drobných kolonií ve středu lytických zón.

Lze předpokládat, že metoda může být zlepšena při použití vhodnějších optických filtrů. Ethidium bromidový filtr, který byl k dispozici jako pevná součást kamery Diana II, propouští světlo s vlnovou délkou v rozsahu přibližně 540–630 nm, a proto je z fluorescence pyrenu využíván pouhý zlomek intenzity. Přechod na vhodnější filtr propouštějící v oblasti přibližně 420–550 nm by měl prudce zvýšit účinnost metody. Rovněž je značná rezerva v lepším osvětlení pomocí difuzérů či odrazových ploch. Je třeba, aby byla plocha misky osvětlena rovnoměrně včetně okrajů u stěn misky, které stíní.

Hledání v dostupné literatuře zatím nepotvrdilo, že by byla podobná metoda používána pro hledání mikroorganismů degradujících PAU dříve. Proto její další zdokonalení a ověření může znamenat důležitý přínos pro hledání nových kmenů degradátorů v přírodě či sledování jejich výskytu

Spektrální změny při úbytku pyrenu

Pro potvrzení skutečného úbytku pyrenu v oblastech lytických zón byla použita fluorescenční spektroskopie. I když existuje řada publikovaných údajů pro spektrální charakteristiky pyrenu, byla spektra získána nezávisle za použitých pokusných podmínek. Je známo, že zejména emisní charakteristiky pyrenu silně závisí na prostředí, v němž se molekuly nacházejí.

Přibližná poloha emisních maxim nedegradovaného pyrenu na kontrolních miskách byla určena při širokospektré excitaci pyrenu v UV oblasti. Poté bylo zjištěno přesné excitační spektrum pří snímání emisního signálu na pevné vlnové délce 380 nm. Znalost excitačního spektra s hlavním maximem na 342 nm (obr. 6) potom posloužila pro nastavení pevného excitačního vlnového pásma 330 ± 5 nm pro zajištění maximální intenzity a specifity emise pyrenu. V následujícím kroku byla zapsána přesná emisní spektra pro půdu z misek s nedegradovaným substrátem a pro misky, kde došlo ke zmizení vrstvy pyrenových krystalků (obr. 6).

U kontrolních (nedegradovaných) misek byla nalezena tři výrazná maxima na 383, 403 a 423 nm (obr. 6), která lze přiřadit píkům ve spektru pyrenu v databázích. Tři charakteristická maxima byla za použitých pokusných podmínek posunuta asi 10 nm do dlouhovlnné oblasti v porovnání s roztoky pyrenu v nepolárních rozpouštědlech. Je ale známo, že fluorescence pyrenu silně závisí na prostředí. Jsou známy posuny charakteristického spektra až o dalších 10 nm k dlouhovlnné oblasti, např. při kovalentní vazbě pyrenu na bílkoviny (Feng et al. 1997).

Na druhou stranu, u degradovaných misek byl jeden hlavní široký pík s maximem přibližně 469 nm. Jak se zdá, tento pík byl ve srovnatelné intenzitě přítomen už před začátkem degradace, i když je na kontrolních miskách slit s charakteristickým spektrem pyrenu. Mizení typických píků odpovídá zřejmě úbytku pyrenu při degradaci aktivní populací. Na druhou stranu i v degradovaných miskách přetrvávají drobné charakteristické píky, které svědčí o přítomnosti zbytků pyrenu. Podle výšky lze odhadnout zbytek asi na 10% výchozího množství. Degradace zřejmě neprobíhá až do úplného vymizení substrátu. Je ale i možná přítomnost ostrůvků bez filmu degradátorů, což je pravděpodobné při výsevu z přírodních nehomogenních vzorků.

Podstata širokého píku s maximem 569 nm není zcela zřejmá. Jak poloha maxima, tak i rozsah píku odpovídají agregované formě molekul pyrenu, tzv. excimerům, jejichž fluorescenční spektrum je známo z literatury. Excimery se tvoří např. při částečném rozpouštění pyrenu v polárních solventech, jako je voda. Rovněž by měla mít podobné spektrum pevná fáze pyrenu v krystalcích. Jako vysvětlení pozorovaných spekter se proto nabízí předpoklad, že:

a) pozorované charakteristické píky pyrenu odpovídají jednotlivým molekulám ve vodné fázi, které se vyskytují díky omezené rozpustnosti pyrenu ve vodě. Jejich

obsah je vysoký i díky počátečnímu nanesení v acetonu, v němž mohl molekulární pyren difundovat do povrchových vrstev agaru.

b) Dlouhovlnná forma (široký pík 569 nm) odpovídá jak pevné fázi, tj. krystalkům pyrenu, tak i excimerům vznikajícím ve vodné fázi. Po degradaci či rozpuštění krystalků již odpovídá jen excimerům, pokud předpokládáme, že přednostně jsou odbourávány jednotlivé molekuly pyrenu.

Závěr

Pomoci výsevů na selektivní půdy bylo nalezeno 6 bakteriálních populací s výraznou schopností rozkládat pyren, který je významným a odolným kontaminantem životního prostředí. Je zřejmé, že výskyt degradátorů této látky je v bakteriálních společenstvech z vhodných lokalit daleko vyšší, než by bylo možné předpokládat podle literárních údajů. Tím jsou určeny možnosti pro budoucí hledání kmenů degradátorů pro biotechnologické účely. Aktivita archivního vzorku dokládá vysokou stálost zúčastněných bakteriálních populací. Pro detekci degradátorů na selektivní půdě byla použita původní metoda fluorescenční fotografie, která doplňuje tradiční metodu založenou na vzniku projasněných zón. Vzhledem k obtížnému hodnocení misek prostým okem dovoluje často fluorescenční metoda jednoznačnější rozhodnutí o přítomnosti mikrobních degradátorů. Předmětem dalšího zkoumání těchto bakterií po probíhajícím vyčištění účinných kmenů by měla být jejich klasifikace a stanovení účinnosti degradace za řízených podmínek.

Seznam literatury

1. **Tuháčková, Jana.** Isolace a charakterisace indigenních mikroorganismů schopných degradovat PAH. Praha : autor neznámý, 2000.

2. **Cajthaml, Tomáš, Pacáková, Věra a Šašek, Václav.** MIKROBIÁLNÍ DEGRADACE POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ. *Chemické listy.* 2001.

3. **Totevová, Sonja, a další.** BAKTERIÁLNÍ DEGRADACE PCB. *Chemické Listy.* 1997.

4. **Pertlík, Jindřich.** www.toxik.arnika.org. *http://www.arnika.org/.* [Online] Arnika. http://www.toxik.arnika.org/chemicke-latky/polychlorovane-bifenyly-pcb.

5. **Cerniglia, Carl.** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 1992.

6. **Kelley, Ingrid a Cergnilia, Carl.** The metabolism of fluoranthene by a species of Mycobacterium. *Journal of Industrial Microbiology.* 1991.

7. **Kelley, Ingrid, a další.** Identification of a Carboxylic Acid Metabolite from the Catabolism of Fluoranthene by a Mycobacterium sp. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* 1991.

8. **Menn, Fu-Min, Applegate, Bruce M. a Sayler, Gary S.** NAH Plasmid-Mediated Catabolism of Anthracene and Phenanthrene to Naphtonic Acids. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* 1993.

9. **Bouchez, M., Blanchet, D. a Vandecasteele, J. P.** The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds . *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996.

10. **Ye, Dingyi, a další.** Degradation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Sphingomonas paucimobilis. *Environ. Sci. Technol.* 1995.

11. **Boldrin, Beate, Tiehm, Andreas a Fritzsche, Christian.** Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene, and Pyrene by a Mycobacterium sp. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* 1993.

12. **Kucerova, R. a Fecko, P.** BIODEGRADATION OF PAU, PCB, AND NEL SOIL SAMPLES FROM THE HAZARDOUS WASTE DUMP IN POZD'ÁTKY (CZECH REPUBLIC). *Physicochemical Problems of Mineral Processing.* 2006.

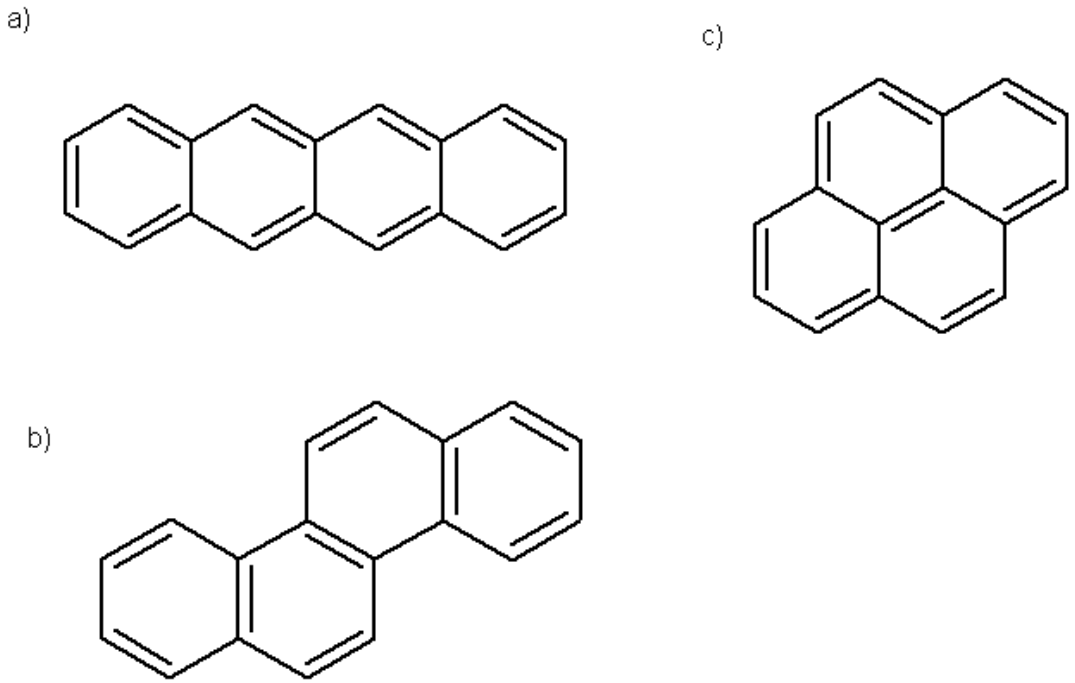
13. **Kim, Seong-Jae, a další.** Complete and Integrated Pyrene Degradation Pathway in Mycobacterium vanbaaleni PYR-1 Based on Systems Biology. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 2007.

14. **Karabika, E., a další.** Taxonomic Identification and Use of Free and Entrapped Cells of a New Mycobacterium sp., Strain Spyr1 for Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Appl Biochem Biotechnol.* 2008.

15. **Rasband, W.** ImageJ. místo neznámé, USA : National Institute of Health. str. http://rsb.info.nih.gov/ij/.

Přílohy

Obrázek 1



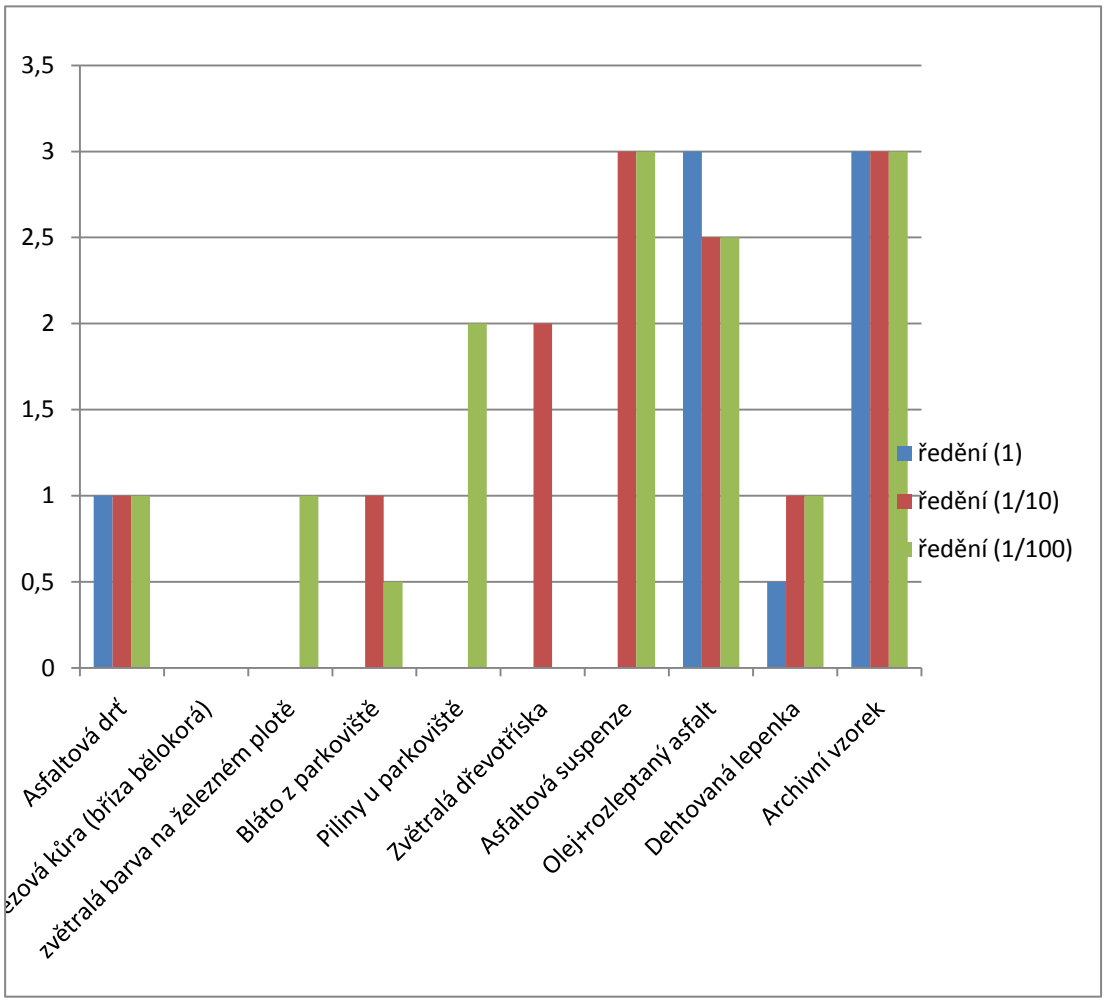
Obrázek 1. Příklady polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) s vysokou molekulovou hmotností. A - tetracen, B - chrysen, C - pyren.

Obrázek 2



Obrázek 2. Areál biologických ústavů AV ČR v Praze - Krči s vyznačenými místy odběru vzorků 1 - 9. Souřadnice pro vzorek č. 1 jsou 50° 1' 2,96" s. š. a 14°27' 52,71" v. d. Měřítko = 80 m.

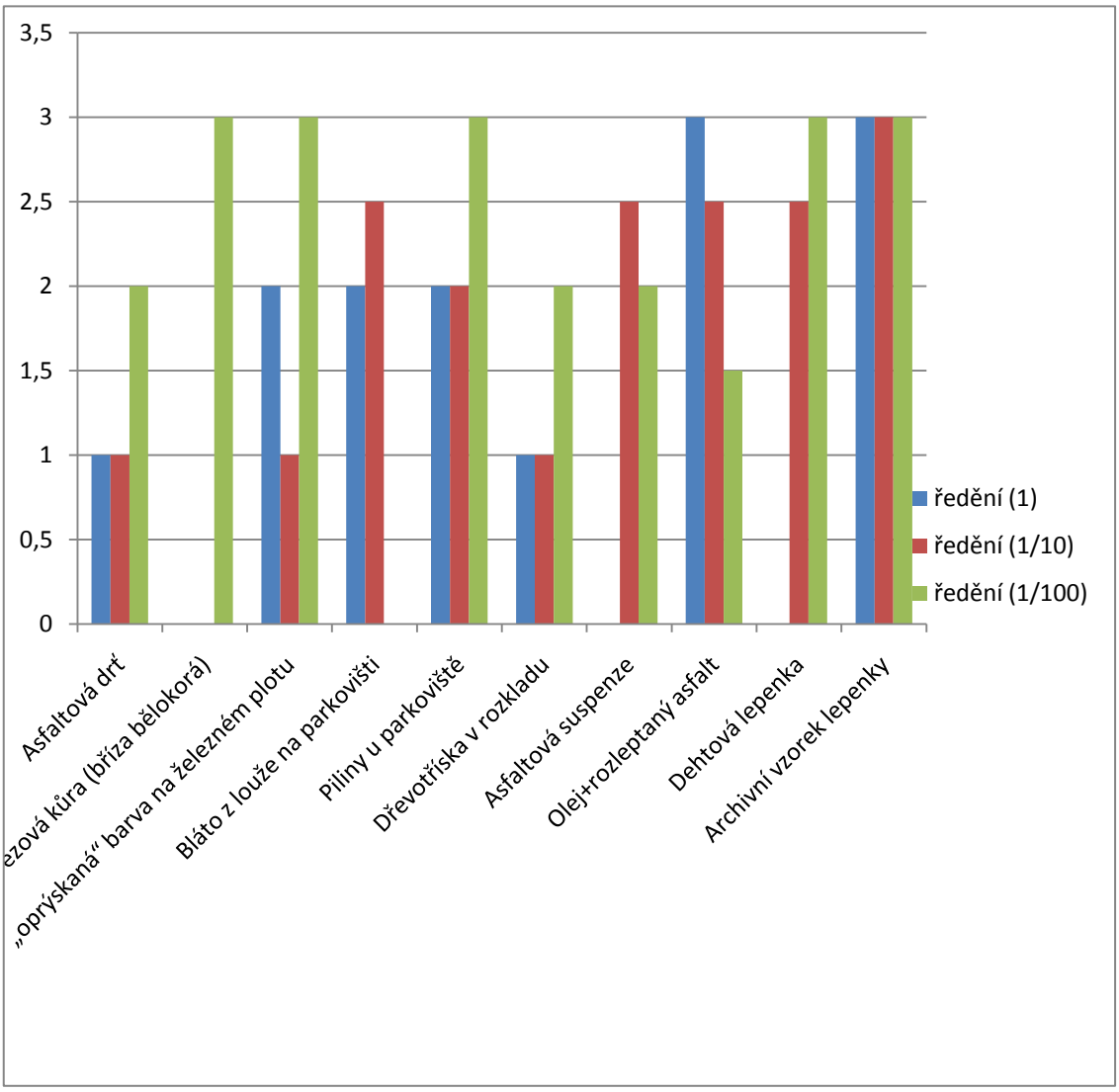
Obrázek 3



Obrázek 3. Degradační aktivita vůči pyrenu v pevné fázi u testovaných vzorků. Primární výsev po inkubaci 14 dní. Aktivita byla hodnocena známkou od 0 do 3.

- 0.....bez aktivity degradace pyrenu
- 1.....náznak aktivity degradace pyrenu
- 2.....střední aktivita degradace pyrenu
- 3.....silná aktivita degradace pyrenu

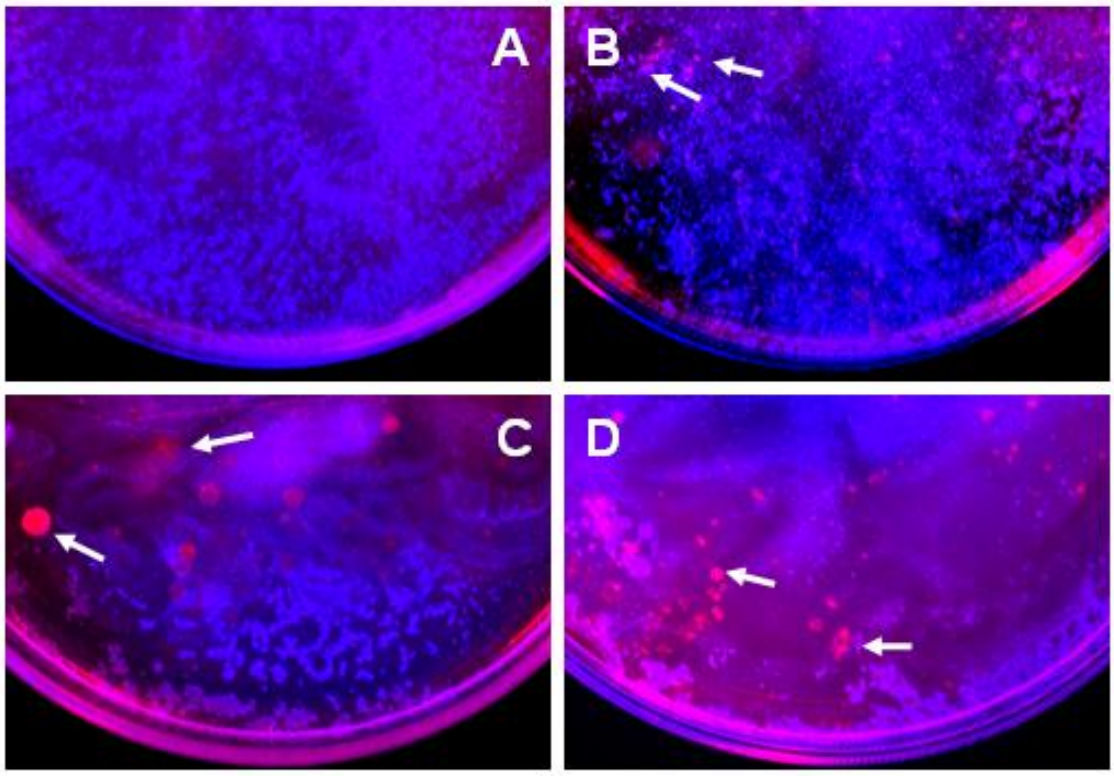
Obrázek 4



Obrázek 4. Degradační aktivita vůči pyrenu v pevné fázi u testovaných vzorků. Primární výsev po prodloužené inkubaci 28 dní. Aktivita byla hodnocena známkou od 0 do 3.

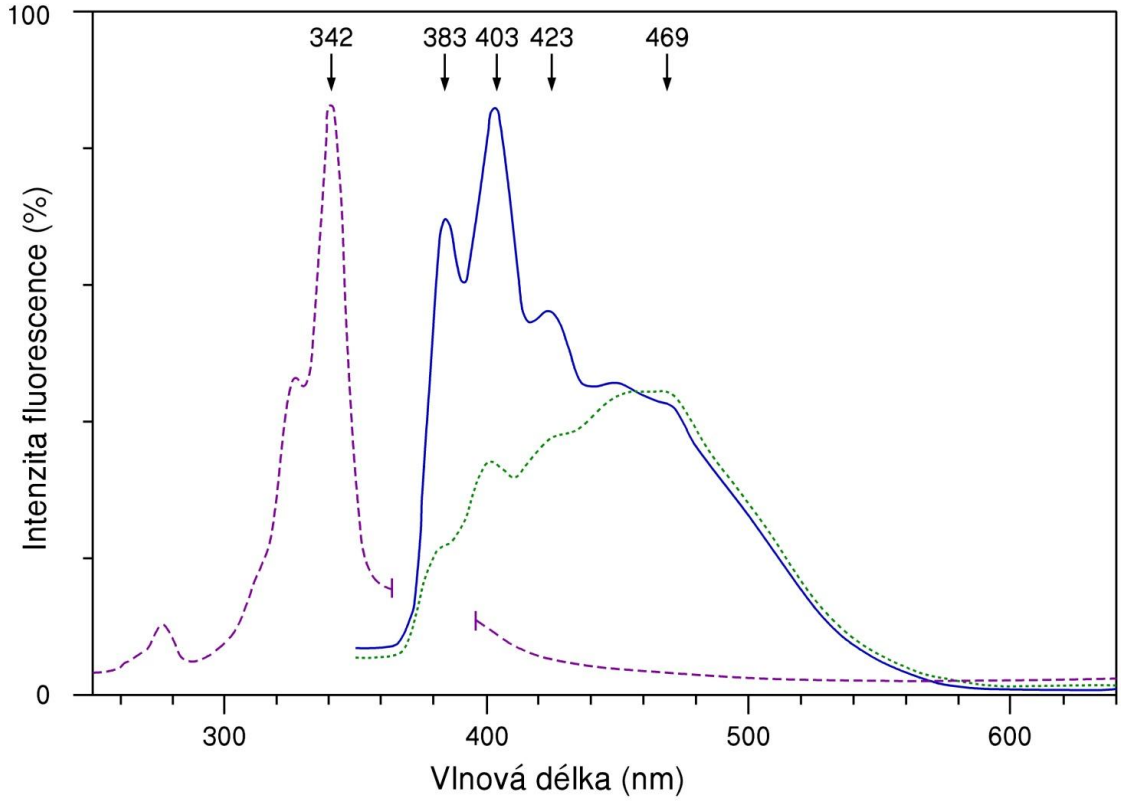
- 0..... bez aktivity degradace pyrenu
- 1..... náznak aktivity degradace pyrenu
- 2..... střední aktivita degradace pyrenu
- 3..... silná aktivita degradace pyrenu

Obrázek 5



Obrázek 5. Vizualizace fluorescence pyrenu (modrá barva) a bakteriálních kolonií v odraženém viditelném světle (červená barva) na detekčních miskách s vrstvou pyrenu. A - kontrolní miska, B - první výsev ze vzorku 8 (olej + asfalt), ředění 10^{-2}; C - vzorek 9 (dehtovaná lepenka), ředění 10^{-3}; D - vzorek 1 (asfaltová drť), ředění 10^{-2}. Oblasti degradace pyrenu jsou tmavé oblasti bez odrazivosti pro viditelné světlo a bez fluorescence. Bakteriální kolonie jsou červené (šipky).

Obrázek 6



Obrázek 6. Excitační a emisní fluorescenční spektra minimální agarové půdy s pyrenovým filmem a po jeho rozkladu. Fialová přerušovaná čára - excitační spektrum nedegradované půdy při pevné emisní vlnové délce 380 ± 2 nm a šířce registračního pásma 2 nm; modrá čára - emisní spektrum nedegradované půdy při pevné excitační vlnové délce 330 ± 5 nm a šířce registračního pásma 2 nm; zelená tečkovaná čára - emisní spektrum půdy po degradaci populací ze vzorku 10 (archivní vzorek, ředění 10^{-2}), podmínky jako u negativní kontroly.