

# Transformace chlorbenzoových kyselin rostlinnými buňkami

Blanka Vrchotová, Martina Macková, Jan Tříška,  
Tomáš Macek

*Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav  
biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha 6*



*Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6*

*Institut systémové biologie a ekologie AV ČR, Branišovská 5, 370 05 České Budějovice*

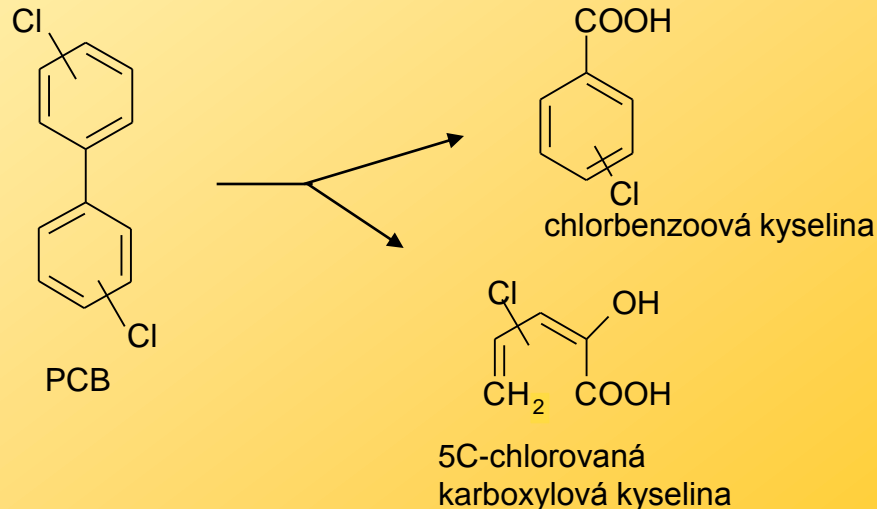


# Úvod

- Degradace chlorbenzoových kyselin
- Transformace chlorbenzoových kyselin rostlinnými buňkami kultivovanými *in vitro*
- Mikrobiální degradace chlorbenzoových kyselin
- Spolupráce rostlin a mikroorganismů na degradaci chlorbenzoových kyselin

# Chlorbenzoové kyseliny

- Herbicid
- Meziprodukt odbourávání některých léků, herbicidů a barviv
- Konečný produkt horní bakteriální dráhy odbourávání PCB



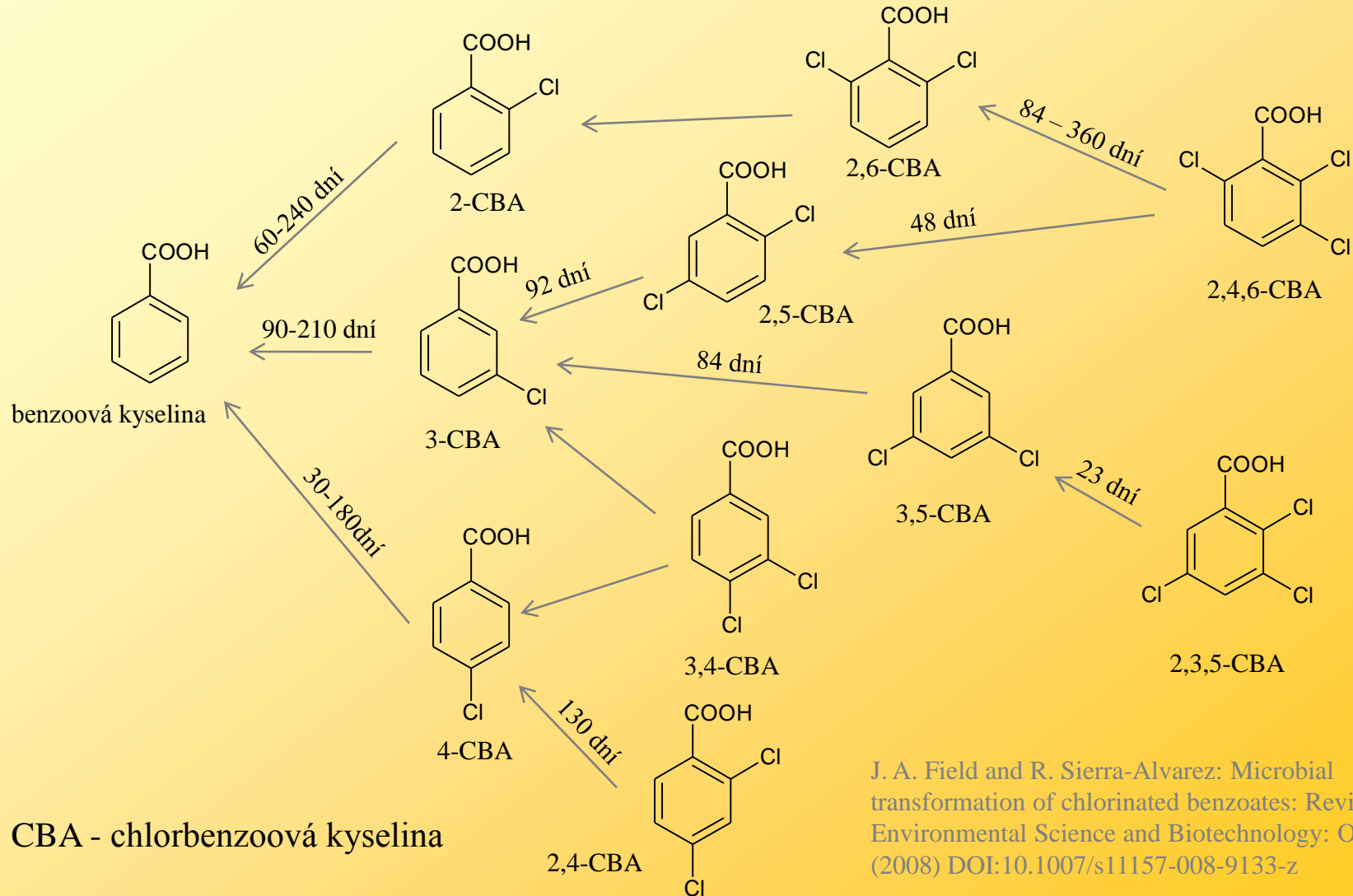
# Degradace chlorbenzoových kyselin

Mikrobiální - anaerobní - redukční dehalogenace

- aerobní ◦ *ortho*  
◦ *meta*  
◦ *para* } degradační  
dráha

Fytoremediace

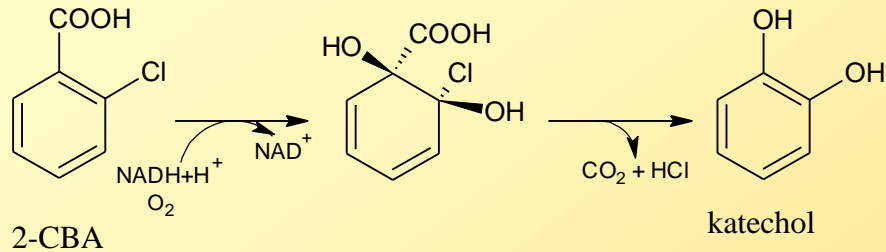
# Mikrobiální anaerobní degradace



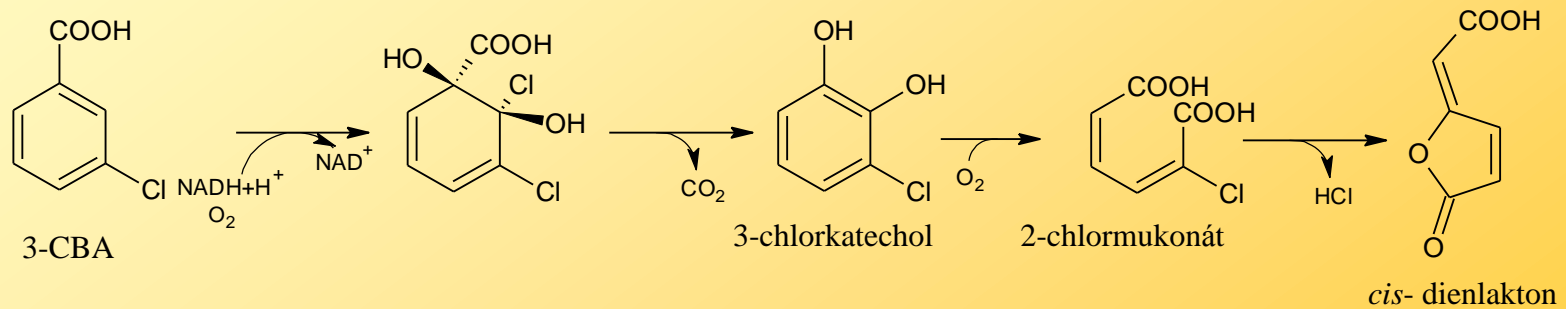
J. A. Field and R. Sierra-Alvarez: Microbial transformation of chlorinated benzoates: Reviews in Environmental Science and Biotechnology: Online first (2008) DOI:10.1007/s11157-008-9133-z

# Mikrobiální aerobní degradace

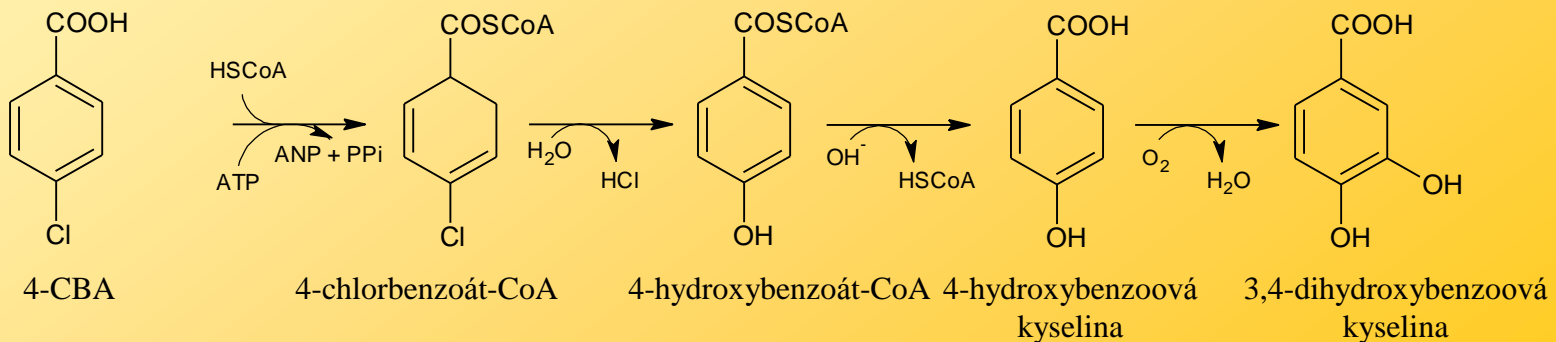
## *ortho* degradační dráha



## *meta* degradační dráha

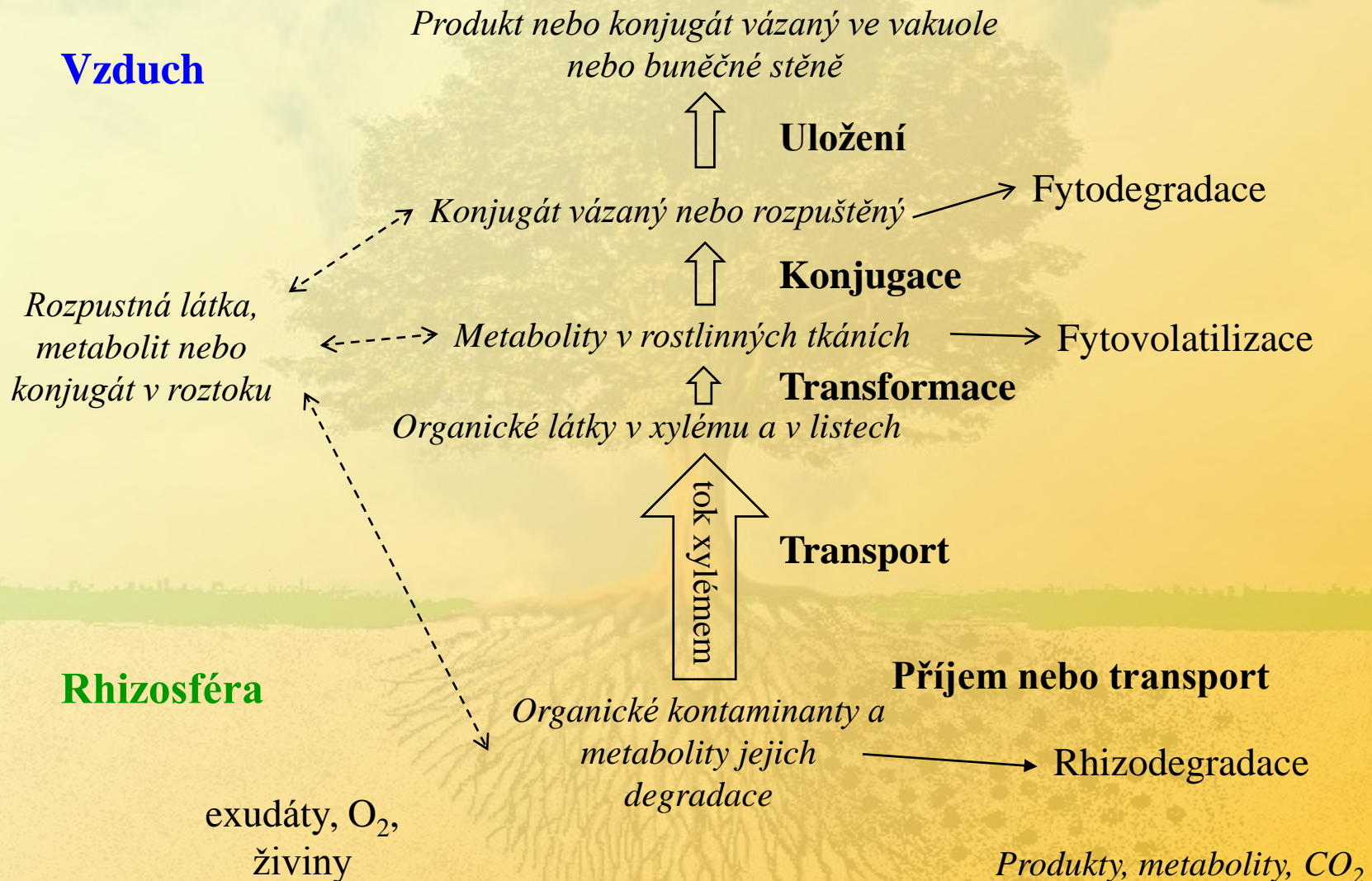


## *para* degradační dráha





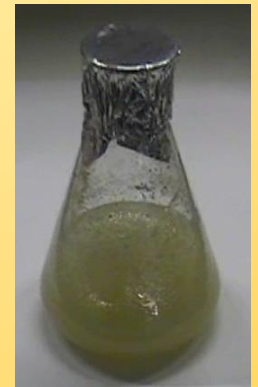
# Fytoremediace



# Použité tkáňové kultury

Tabák viržinský - amorfní kalus

(*Nicotiana tabacum*) WSC 38



Lilek černý - „hairy root“

(*Solanum nigrum*) SNC 90

Křen selský - embryogenní klon s výhonky

(*Armoracia rusticana*) K 54





# Sledování přeměny chlorbenzoových kyselin

Zůstatek v médiu po 14 dnech kultivace [%]

	poč. konc. [mg/l]	2-CBA	3-CBA	4-CBA	2,3-dicBA	2,4-dicBA	2,5-dicBA	2,6-dicBA	3,4-dicBA	3,5-dicBA	2,3,5-tricBA	2,4,6-tricBA
K 54	200	5 3	90 3	82 3	77 5	65 2	77 5	66 10	93 3	92 6	95 7	90 2
	50	2 2	76 1	41 9	8 2	2 1	4 2	65 8	76 4	74 1	57 4	36 4
SNC 90	200	13 5	91 8	99 6	58 10	61 10	65 8	80 5	89 12	95 12	88 11	95 2
	50	6 3	0 0	0 1	0 1	2 2	2 1	68 3	86 4	99 2	6 1	88 1
WSC 38	200	88 7	95 6	94 5	99 6	79 9	85 4	98 2	98 6	100 5	96 9	99 3

K 54 - křen selský (*Armoracia rusticana*)

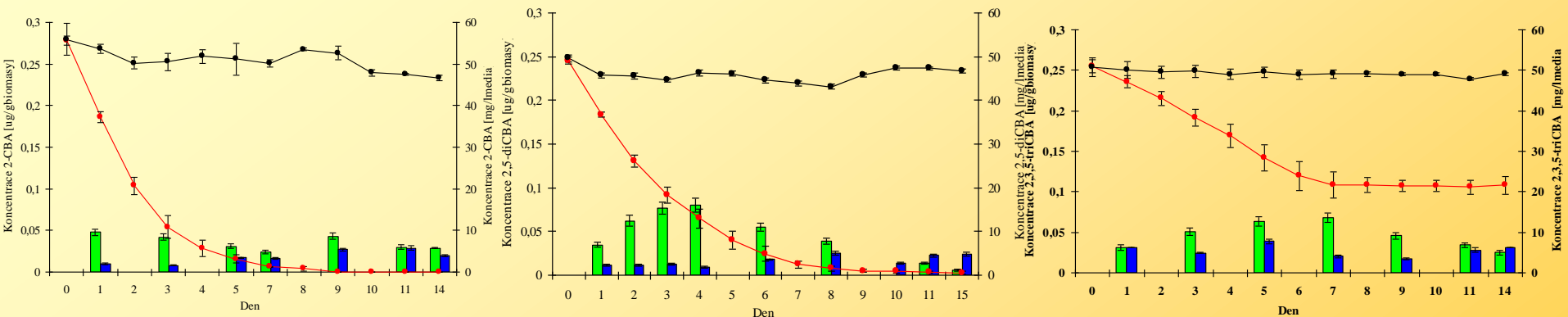
SNC 90 - lilek černý (*Solanum nigrum*)

WSC 38 - tabák viržinský (*Nicotiana tabacum*)

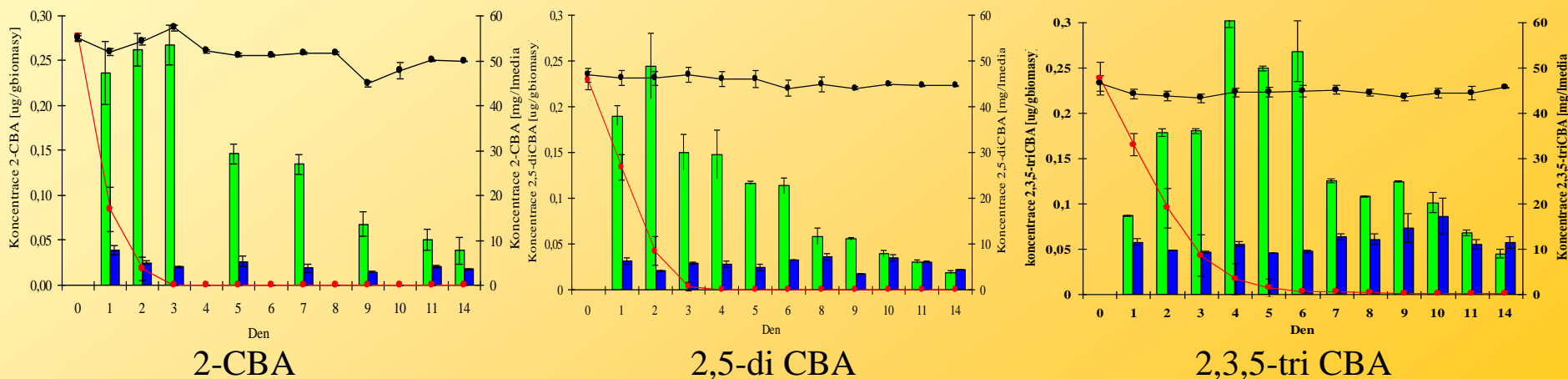
CBA – chlorbenzoová kyselina

# Porovnání kinetiky transformace

## Křen selský (*Armoracia rusticana*)



## Lilek černý (*Solanum nigrum*)



biomasa

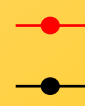


vzorek



kontrola

medium



vzorek



kontrola

# Identifikace degradačních produktů

- **V mediu** po kultivaci *Solanum nigrum* a *Armoracia rusticana*

byly identifikovány methylestery 2,3-di a 2,4-dichlorbenzoové kyseliny

- **V biomase** po kultivaci *Solanum nigrum* s 2,5-dichlorbenzoovou kyselinou

byl identifikován hydroxyderivát dichlorbenzoové kyseliny

# Reakce s rostlinnými mikrosomy

- Izolace z biomasy lilku černého a křene selského
- Stanovení koncentrace cytochromu P450 metodou diferenčních spekter
- Stanovení celkové koncentrace bílkovin
- Měření aktivity CYP 1A1/2
- Reakce mikrosomů s chlorbenzoovými kyselinami

Úbytek 2,5-diCBA [%]		Koncentrace mikrosomálního proteinu [ $\mu\text{g/ml}$ ]					
		30		100		300	
		2,5 h	21 h	2,5 h	21 h	2,5 h	21 h
Koncentrace 2,5-diCBA [mg/l]	10	<b>29</b>	<b>27</b>	2	1	1	3
	30	2	1	1	<b>26</b>	<b>9</b>	<b>17</b>
	50	2	3	1	1	2	2
	100	1	2	1	1	0	0

# Izolace CBA degraderů

- Ze zeminy kontaminované PCB 300 mg/kg Delor 103 (Žamberk)
- Izolovány kmeny A7, A8, A18 a A19
- Identifikovány pomocí NEFERM testu

A7, A8

*Pseudomonas fluorescens*

A18

*Pseudomonas pseudoalcaligenes*

A19

*Pseudomonas stutzeri*

# Mikrobiální degradace CBA

Počáteční koncentrace CBA 200 mg/l

	Zůstatek CBA po 5 denní kultivaci [%]							
	A7		A8		A18		A19	
2-CBA	0	0	0	0	0	0	0	0
3-CBA	78	7	0	0	8	7	74	4
4-CBA	99	1	104	4	99	1	95	1
2,3-diCBA	0	0	1	1	0	0	0	0
2,4-diCBA	70	10	93	3	97	4	92	5
2,5-diCBA	0	0	0	0	0	0	0	0
2,6-diCBA	101	2	75	9	98	1	100	2
3,4-diCBA	73	3	99	4	99	1	101	1
3,5-diCBA	99	0	88	6	101	8	102	2
2,3,5-triCBA	87	4	87	2	72	6	96	4
2,4,6-triCBA	102	3	105	8	102	3	99	17

CBA – Chlorbenzoová kyselina

A7, A8, A18, A19 – *Pseudomonas* sp.



# Porovnání rostlin a mikroorganismů

## Mikroorganismy

Počáteční koncentrace 200 mg/l

A7, A19 - 2-CBA; 2,3-diCBA; 2,5-diCBA

A8, A18 - 2-CBA; 3-CBA; 2,3-diCBA; 2,5-diCBA

## Rostliny

Počáteční koncentrace 200 mg/l

Lilek - 2-CBA; 2,3-diCBA; 2,4-diCBA; 2,5-diCBA

Křen - 2-CBA; 2,4-diCBA; 2,6-diCBA

Tabák - žádná metabolisace

Počáteční koncentrace 50 mg/l

Lilek + 3-CBA; 4-CBA; 2,3,5-triCBA

Křen + 4-CBA; 2,3-diCBA; 2,5-diCBA; 2,3,5-triCBA; 2,4,6-triCBA

# Spolupráce rostlin a mikroorganismů

	Zůstatek CBA [%]				
	0 den	2 den	4 den	11 den	14 den
SNC + 2,5-diCBA	100 6	122 15	100 10	113 17	76 9
SNC + 2,5-diCBA + A7	100 16	8 9	0 0	0 0	0 0
SNC + 2,5-diCBA + A8	100 24	8 7	0 0	0 0	0 0
2,5-diCBA + A7	100 7	39 5	21 3	17 4	11 2
2,5-diCBA + A8	100 15	32 9	8 11	8 7	6 5
SNC + 3-CBA	100 10	94 6	83 5	74 8	77 7
SNC + 3-CBA + A7	100 16	89 7	49 6	0 0	0 0
SNC + 3-CBA + A8	100 7	17 5	1 0	0 0	0 0
3-CBA + A7	100 16	88 11	73 20	0 0	0 0
3-CBA + A8	100 6	11 9	2 2	0 0	0 0
SNC + 2,3,5-triCBA	100 22	100 3	100 3	98 3	97 3
SNC + 2,3,5-triCBA + A7	100 26	103 2	102 2	100 0	96 4
SNC + 2,3,5-triCBA + A8	100 16	100 2	99 3	91 2	86 2
2,3,5-triCBA + A7	100 6	101 2	100 2	100 2	99 2
2,3,5-triCBA + A8	100 10	96 3	94 3	84 2	63 2

CBA - chlorobenzoová kyselina

SNC – Lilek černý (*Solanum nigrum*)

A7, A8 – *Pseudomonas* sp.

# Celkové počty mikroorganismů

	MO [cfu *10 <sup>5</sup> ]	Vypočítané kritérium pro ANOVA
SNC + 2,5-diCBA + A7	82 31	<b>51,83</b>
2,5-diCBA + A7	8 49	
SNC + 2,5-diCBA + A8	37 19	<b>25,59</b>
2,5-diCBA + A8	4 2	
SNC + 3-CBA + A7	40 9	<b>20,13</b>
3-CBA + A7	2 1	
SNC + 3-CBA + A8	36 9	1,98
3-CBA + A8	27 7	
SNC + 2,3,5-triCBA + A7	30 9	<b>8,30</b>
2,3,5-triCBA + A7	9 5	
SNC + 2,3,5-triCBA + A8	60 13	0
2,3,5-triCBA + A8	32 17	

S 95 % pravděpodobností  
lilek podporuje přežití a  
množení mikroorganismů  
v označených případech

CBA - chlorbenzoová kyselina

SNC - Lilek černý (*Solanum nigrum*)

A7, A8 - *Pseudomonas* sp.

Analýza rozptylu (ANOVA)  $\alpha = 0,05$

$F(1,16) = 4,5$

# Koncentrace CBA v biomase

	[ $\mu\text{g/g}$ suché biomasy]	
SNC	0	0
SNC + 2,5-diCBA	1972	579
SNC + 2,5-diCBA + A7	71	33
SNC + 2,5-diCBA + A8	35	19
SNC + 3-CBA	1513	451
SNC + 3-CBA + A7	556	241
SNC + 3-CBA + A8	107	75
SNC + 2,3,5-triCBA	1869	87
SNC + 2,3,5-triCBA + A7	1816	629
SNC + 2,3,5-triCBA + A8	1619	188

CBA - chlorbenzoová  
kyselina

SNC – Lilek černý  
(*Solanum nigrum*)

A7, A8 – *Pseudomonas* sp.

# Závěr

- Rostlinné buňky jsou schopné metabolizovat CBA s různou účinností v závislosti na rostlinném druhu, koncentraci CBA počtu a poloze chlorů
- Ze zkoumaných druhů nejvyšší aktivitu prokázaly buňky lilku černého s mono a diCBA
- Identifikovány - v médiu - methylester 2,3-diCBA a 2,4-diCBA  
- v biomase - hydroxyderivát diCBA
- Křenové mikrosomy byly schopné katalyzovat přeměnu 2,5-diCBA
- Izolované bakt. kmeny degradovaly 2-; 3-; 2,3-di a 2,5-diCBA
- Kmeny A7 a A8 ve spolupráci s lilkem černým degradovaly 3- a 2,5-diCBA

# Děkuji za pozornost

Tato práce byla financována z grantů Centrum 1M06011 a FRVŠ 1157/2008,  
GAČR 203/06/0563 a MŠM 6046137305.