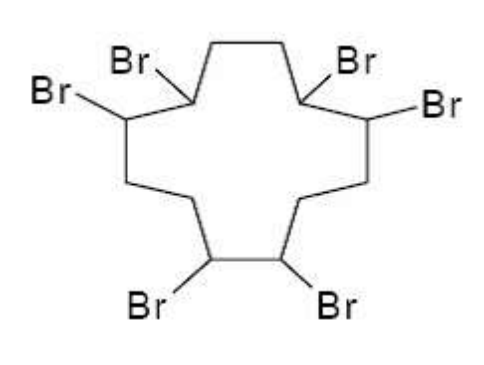
AKUMULACE HEXABROMCYKLODODEKANU V ROSTLINNÉ TKÁNI

Jana Vrkoslavová (Zlámalíková), Kateřina Demnerová, Martina Macková, Tomáš Macek, Jana Hajšlová, Petra Hrádková, Hana Stiborová

MŠMT NPVII 2B06151, GA ČR 104/08/P188, MSM 6046137305

HEXABROMCYKLODODEKAN (HBCD)

- **Aditivní** retardátor hoření
- Používání od 80. let 20. stol.
- **Výskyt**: vzduch (prachové částice), voda, sedimenty ⇒ ryby, ptáci; kaly ČOV
- **Zdroje**: výroba a využití materiálů obsahující HBCD (textil, stavební materiál – XPS, EPS), recyklace, skládkování, spalování
- Vysoce bioakumulativní (zejména u ryb)
- Chronická toxicita: zvětšení jater, thyroidní hyperplasie, inhibice oogeneze



FYTOREMEDIACE

- Využití zelených rostlin a s nimi asociovaných mikroorganismů , půdních doplňků a agronomických technik pro odstranění či transformaci kontaminantů z životního prostředí.

- **Fytoremediační mechanismy**
  - Fytoakumulace (fytoextrakce)
  - Fytodegradace (fytotransformace)
  - Fytostabilizace
  - Fytovolatilizace
  - Rhizodegradace (fytostimulace)
  - Rhizofiltrace

Soudek Petr a kol.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. Chem. Listy 102, 346-352 (2008)

EXPERIMENT

- **Substráty**:
  - kal z ČOV Jihlava
  - zahradický substrát obohacený o HBCD (100 ng/g sušiny)
- **Rostliny**:
  - lilek černý (*Solanum nigrum*)
  - tabák viržinský (*Nicotiana tabacum*)
  - neosázený substrát (kontrola)

} **Potvrzena akumulace PBDE**
Zlámalíková a kol., Sanační technologie 2008

- Každá varianta provedena v 5 květináčích (V = 200ml) vyložených alobalem
- Rostliny byly pěstovány při laboratorní teplotě s pravidelnou zálivkou
- Experiment trval 3 měsíce

CÍLE EXPERIMENTU

- Analýza obsahu HBCD v substrátech a rostlinách (Soxhletova extrakce, LC/MS-MS)
- Vzhled rostlin a množství vzniklé biomasy
- Celkový počet mikroorganismů v substrátu
- Změny ekotoxicity
- Změny mikrobiální diverzity

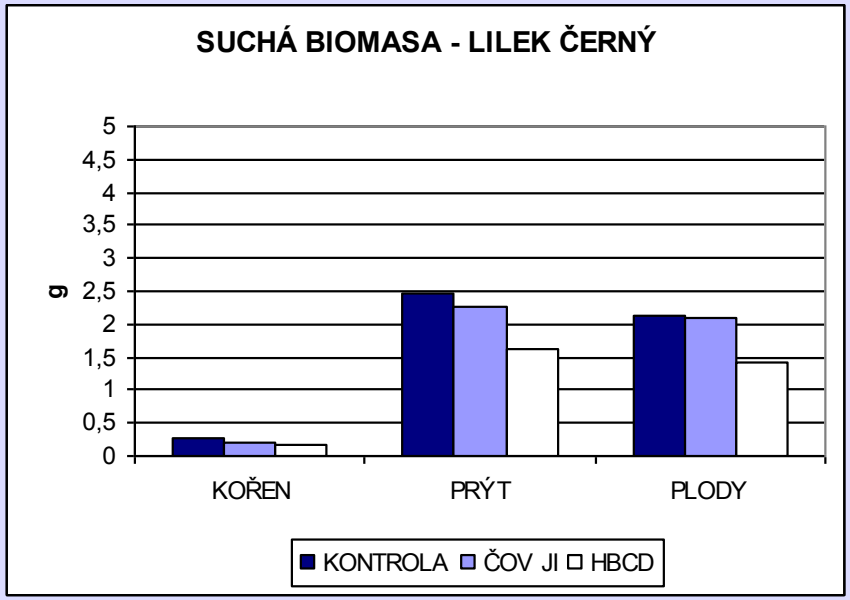
ANALÝZA HBCD (LC-MS/MS)

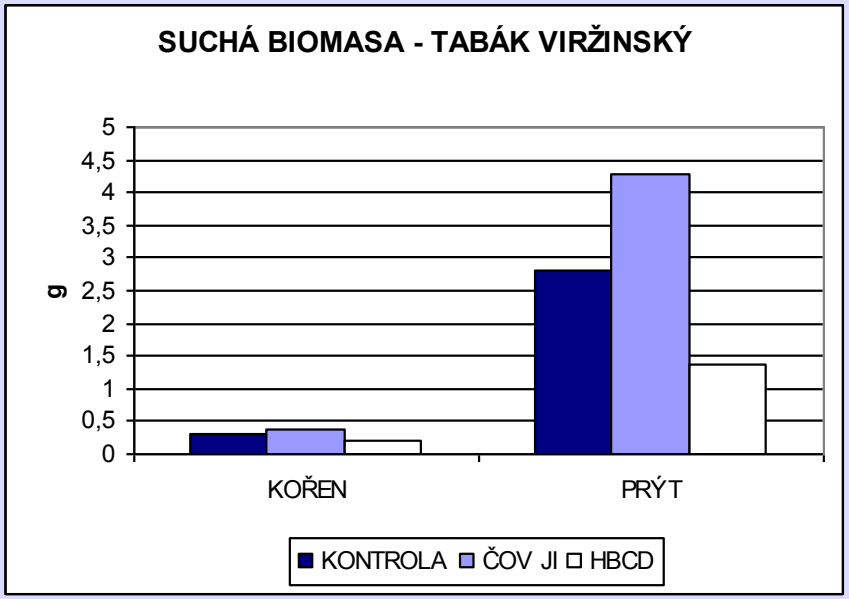
MNOŽSTVÍ HBCD / [ng/g SUŠINY]			
VZOREK		KAL ČOV JIHLAVA	ZAHRADNICKÝ SUBSTRÁT + HBCD
PŮVODNÍ		74,6	123,9
NEOSÁZENÝ		72,5	146,6
LILEK	SUBSTRÁT	78,2	188,6
	KOŘEN	0	0
	STONEK	0	0
	LISTY	0	0
	PLODY	0	0
TABÁK	SUBSTRÁT	73,8	180,0
	KOŘEN	0	0
	STONEK	0	0
	LISTY	0	0
	PLODY	-	-

MNOŽSTVÍ PBDE / [ng/g SUŠINY]					
VZOREK		KAL ČOV HR. KRÁLOVÉ BDE209		ZAHRADNICKÝ SUBSTRÁT + BDE209	
		∑PBDE	BDE209	∑PBDE	BDE209
PŮVODNÍ		716,0	2236,4	2,0	5191,1
NEOSÁZENÝ		748,1	1877,4	2,4	3658,8
LILEK	SUBSTRÁT	815,2	2377,2	3,1	7624,8
	KOŘEN	25,9	28,2	2,8	133,3
	STONEK	8,1	0,8	10,0	2,2
	LISTY	3,6	0	47,2	5,7
	PLODY	5,4	1,21	7,9	2,7
TABÁK	SUBSTRÁT	724,9	1293,6	3,2	7248,7
	KOŘEN	49,3	0	2,2	68,9
	STONEK	2,8	0	2,3	1,0
	LISTY	3,0	16,1	26,8	5,4
	PLODY	-	-	-	-

MNOŽSTVÍ SUCHÉ BIOMASY

- **BIOMASA** je souhrn látek tvořících těla všech živých organismů, jak rostlin, bakterií, sinic a hub, tak i živočichů. (http://cs.wikipedia.org)
- **Sušení** probíhalo při teplotě 50°C
- Po 3 měsících

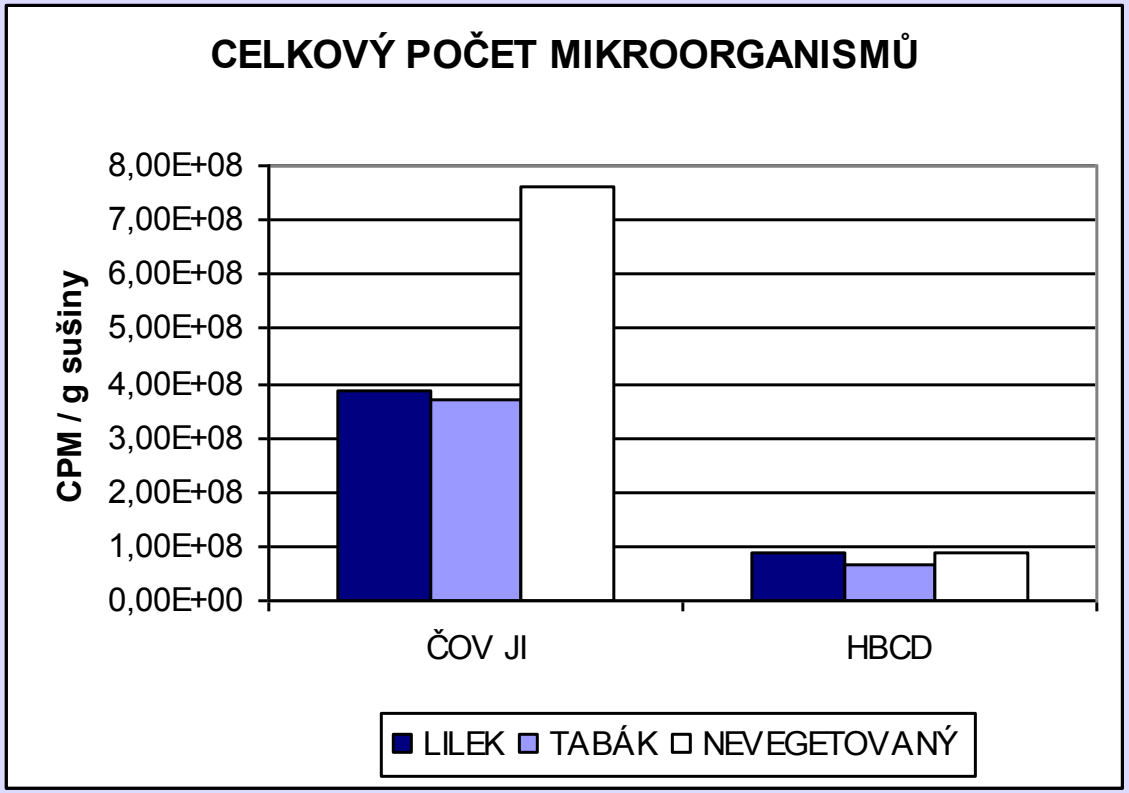




KONTROLA: ROSTLINY PĚSTOVANÉ V ZAHRADNICKÉM SUBSTRÁTU

CELKOVÝ POČET MIKROORGANISMŮ

(po 3 měsících)



TESTY EKOTOXICITY

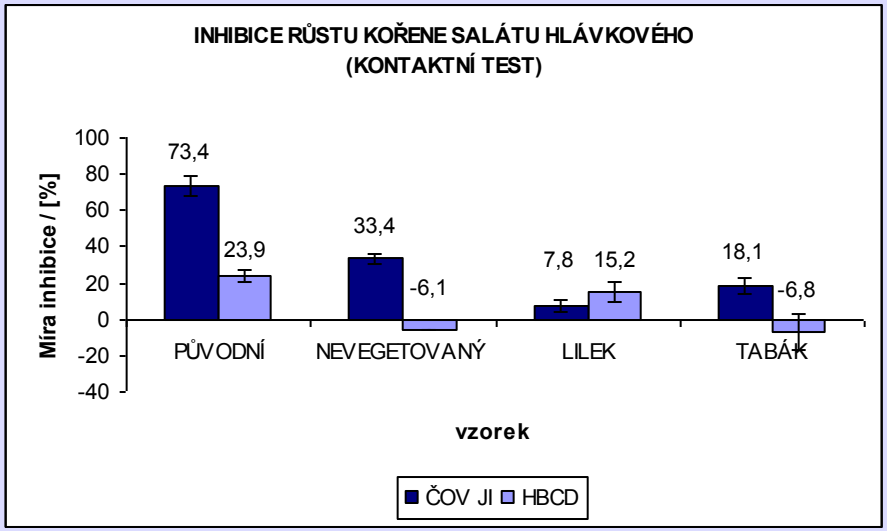
- Provedeny na počátku experimentu a po jeho ukončení
- Využity 3 testy ekotoxicity:

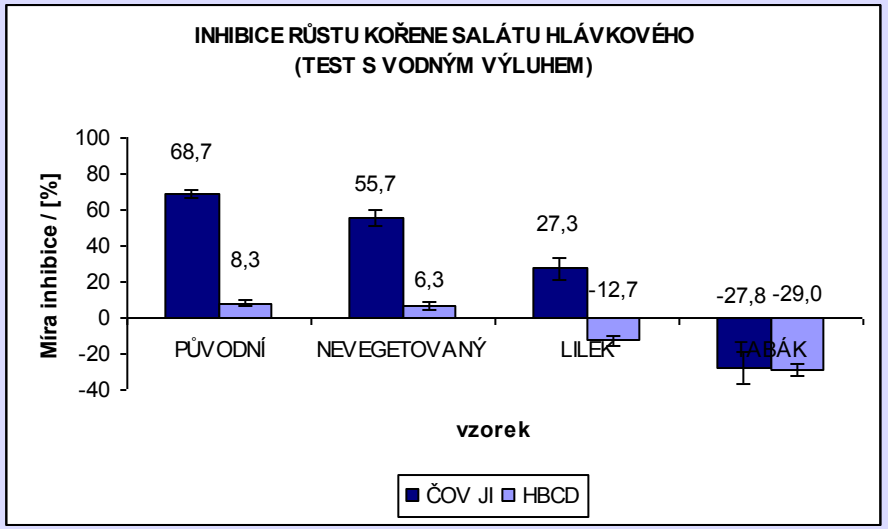
1) **Test inhibice růstu kořene salátu hlávkového ve vodném výluhu**

2) **Test inhibice růstu kořene salátu hlávkového kontaktním testem - modifikovaná metoda**

3) **Stanovení inhibičního účinku na světelnou emisi bakterie *Vibrio fischeri***

TESTY INHIBICE RŮSTU KOŘENE SALÁTU HLÁVKOVÉHO

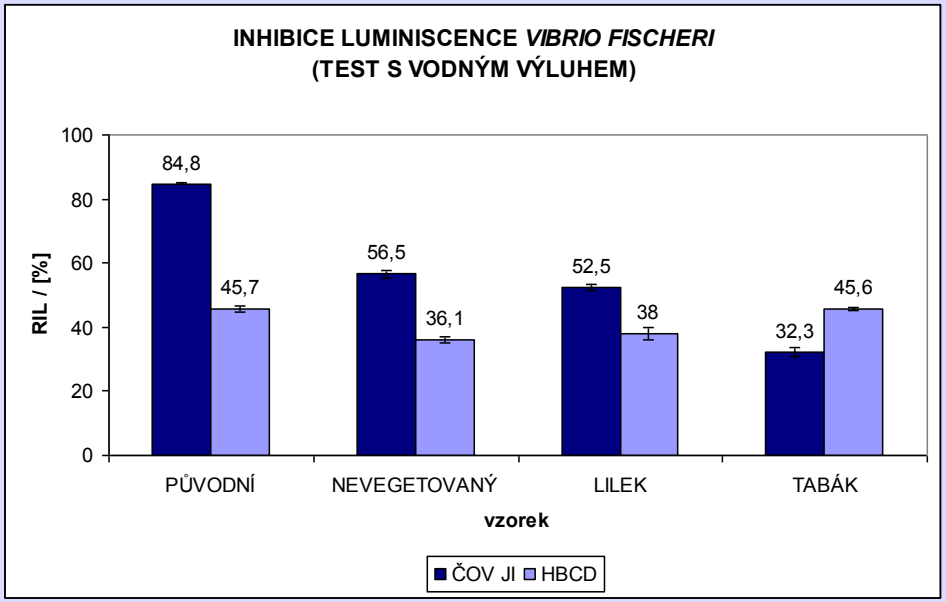




POKLES TOXICITY KALU / VÝLUHU PO 3 MĚSÍCÍCH FYTOREMEDIACE / [%]

SUBSTRÁT	ČOV JIHLAVA			HBCD		
VARIANTA	NEVEGE-TOVANÝ	LILEK	TABÁK	NEVEGE-TOVANÝ	LILEK	TABÁK
KONTAKTNÍ TEST	54,5	89,4	75,3	**125,5**	36,4	128,5
VÝLUHOVÝ TEST	18,9	60,3	140,5	24,1	253,0	449,4

TEST INHIBICE LUMINISCENCE *VIBRIO FISCHERI*



POKLES TOXICITY VÝLUHU PO 3 MĚSÍCÍCH FYTOREMEDIACE / [%]						
SUBSTRÁT	**ČOV JIHLAVA**			**HBCD**		
VARIANTA	**NEVEGE-TOVANÝ**	**LILEK**	**TABÁK**	**NEVEGE-TOVANÝ**	**LILEK**	**TABÁK**
ZMĚNA RIL	33,4	38,1	61,9	**21,0**	16,8	0,2

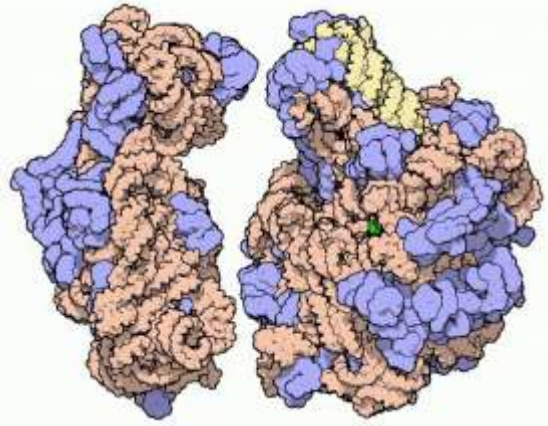
ANALÝZA MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY

- Pomocí molekulárně-biologických metod

- **Obecná strategie:**
  Izolace DNA ze vzorku ⇒ amplifikace genů kódujících 16S rRNA ⇒ analýza produktů pomocí metod TTGE a SSCP

- **Proč právě 16S rRNA?**

- 16S rRNA = hlavní složka ribozomů
- funkce ribozomů = syntéza proteinů ⇒ tendence zachovávat primární strukturu rRNA ⇒ **rozdíly v sekvenci rRNA = odlišnost v rodovém původu**



Malá a velká podjednotka bakteriálního ribozomu

METODY TTGE A SSCP

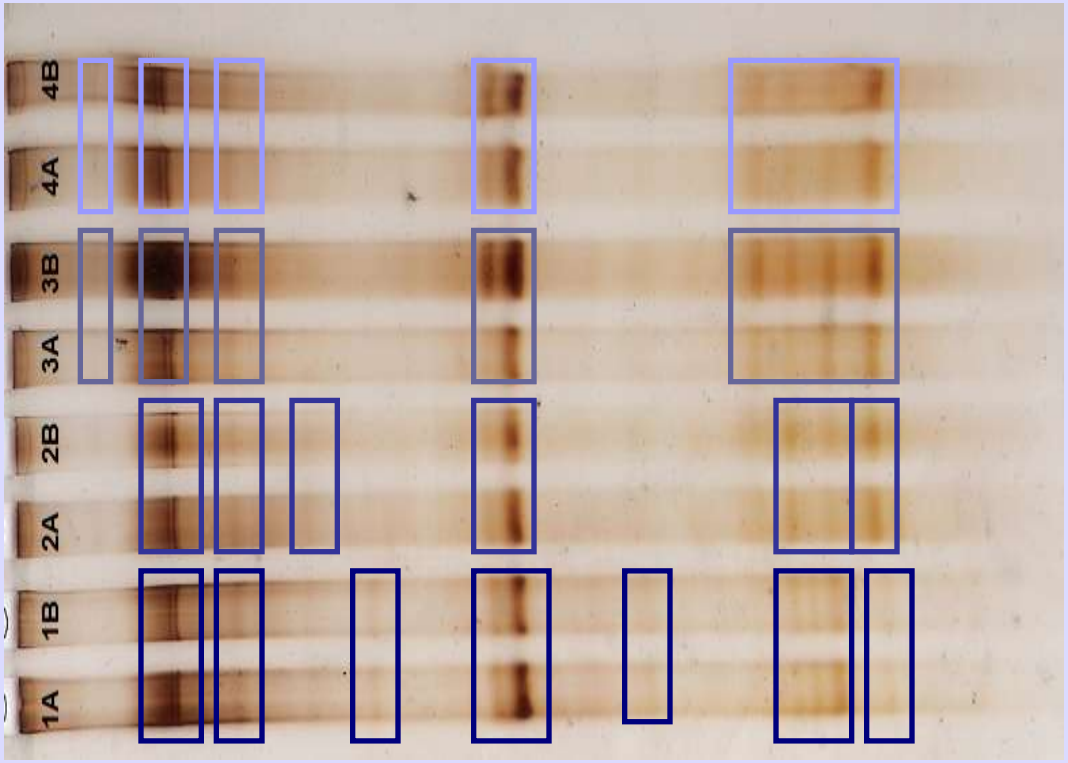
TTGE = Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

- Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, jehož teplota je postupně zvyšována
- Separace fragmentů 16S rDNA stejné délky, ale rozdílného zastoupení párů nukletidových bazí guanin + cytosin (%G+C)
- Separace je vyvolána zvyšováním teploty gelu
- **NEVÝHODA**: Tvorba tzv. heteroduplexů, které mají stejné procentuální zastoupení párů guanin + cytosin, ale různou sekvenci

SSCP = Single Strand Conformation Polymorphism

- Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
- Separace fragmentů ssDNA (single strand DNA) stejné délky, ale různé konformace
- **NEVÝHODA**: Existence fragmentů ssDNA v několika konformacích

ZMĚNY PROFILU TTGE BĚHEM FYTOREMEDIACE



4A, 4B … TABÁK

3A, 3B … LILEK

2A, 2B … NEVEGETOVANÝ KAL

1A, 1B … PŮVODNÍ KAL

FOTODOKUMENTACE

LILEK

TABÁK

ZAHRADNICKÝ SUBSTRÁT

ČOV JIHLAVA

HBCD

ZÁVĚR

1) Růstová charakteristika rostlin

- Viditelné rozdíly

2) Akumulace HBCD v rostlinné tkáni

- Nebyla potvrzena

3) Změna ekotoxicity

a) Testy se salátem hlávkovým

- Pokles toxicity

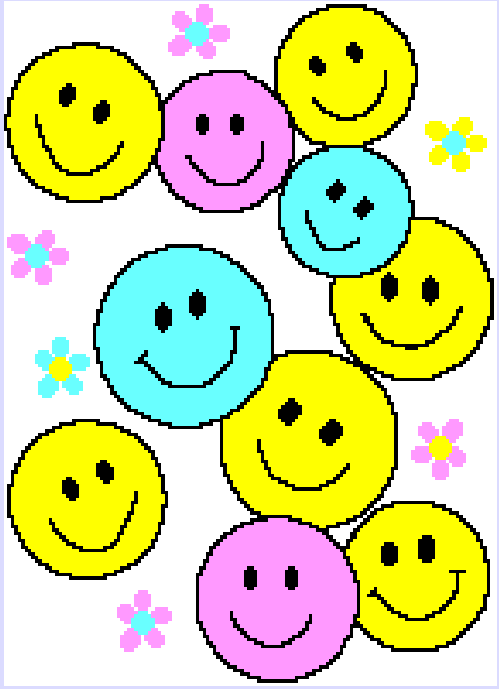
b) Test s *Vibrio fischeri*

- Rozdíly toxicity minimální $\Rightarrow$ vyšší citlivost na přítomnost toxických látek

4) Analýza mikrobiální diverzity

- Viditelné rozdíly, zejména mezi původním vzorkem kalu a zbylými vzorky

5) Další cíle

- Optimalizace metody TTGE
- Provedení a optimalizace metody SSCP

DĚKUJI ZA POZORNOST