

# Vliv přírodních látek na složení bakteriálních společenstev v zemině kontaminované PCB

**Bc. Lucie Musilová**

**Ing. Ondřej Uhlík, Ph. D.**

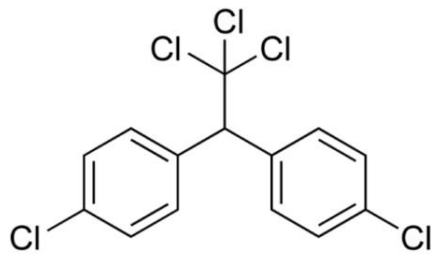
**prof. Dr. Ing. Martina Macková**

**doc. Ing. Tomáš Macek, CSc.**

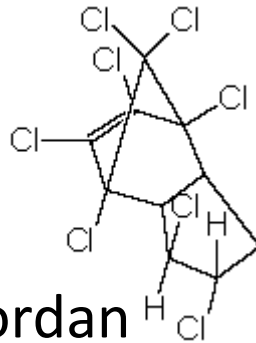


**VYSOKÁ ŠKOLA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
V PRAZE**

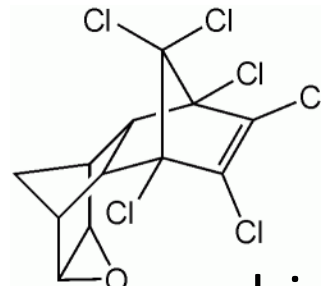
# Perzistentní organické polutanty



DDT

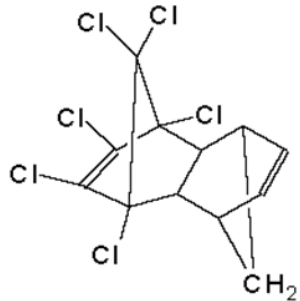
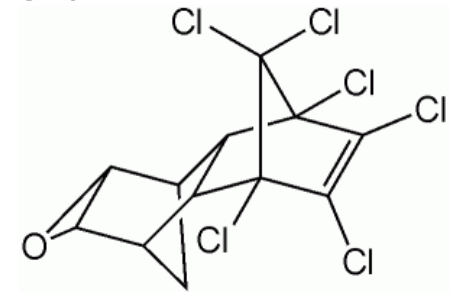


chlordan

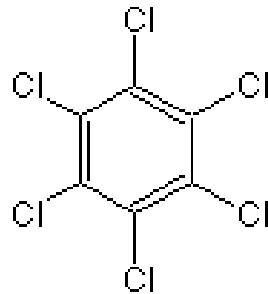


endrin

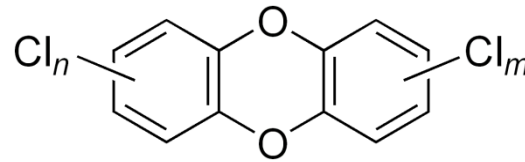
dieldrin



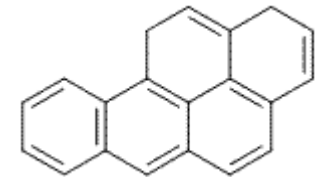
aldrin



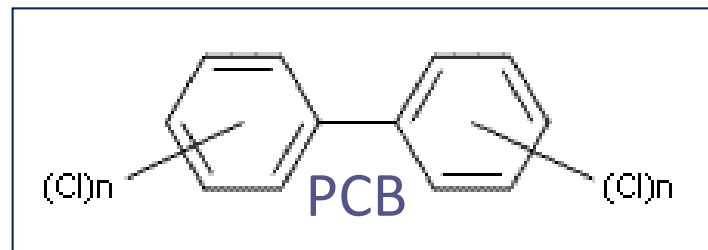
hexachlorbenzen



PCDD



benzo[a]pyren

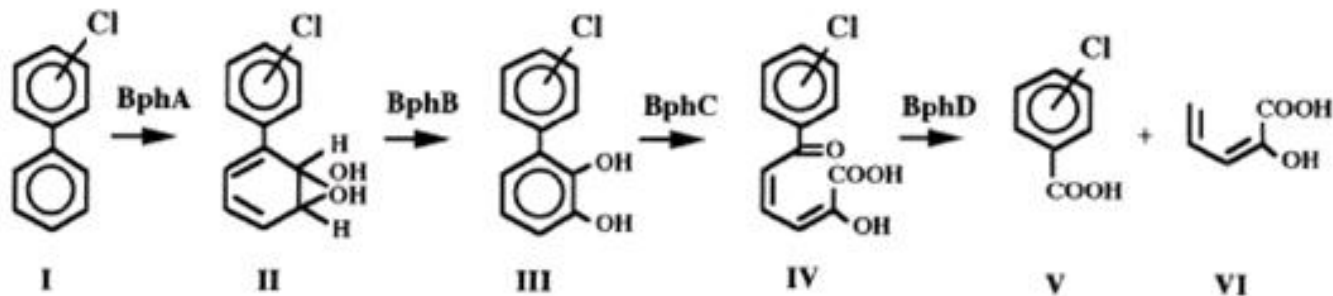


# Polychlorované bifenyly

- transformátorové oleje, izolátory, nehořlavé složky barev, hydraulické kapaliny a další
- od 30. let 20. století – případy intoxikace a akumulace v prostředí
- fyzikálně-chemické odbourávání je nákladné

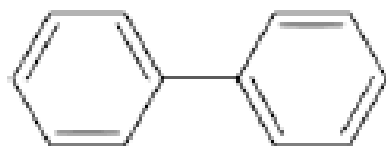
# Mikrobiální degradace PCB

- anaerobní degradace – dehalogenace, zvýšení biologické dostupnosti PCB pro další organismy
- aerobní degradace – účast enzymů kódovaných v bifenylovém (*bph*) operonu

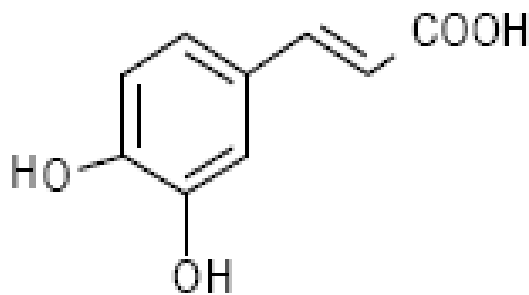


# Induktory bifenylového operonu

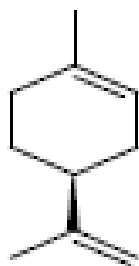
- bifenylyl



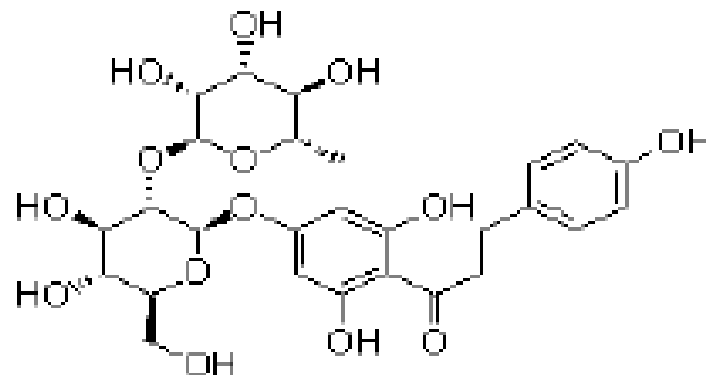
- sekundární metabolity rostlin – strukturní podobnost



kys. kávová



(S)-limonen



naringin

# Sekundární metabolity rostlin

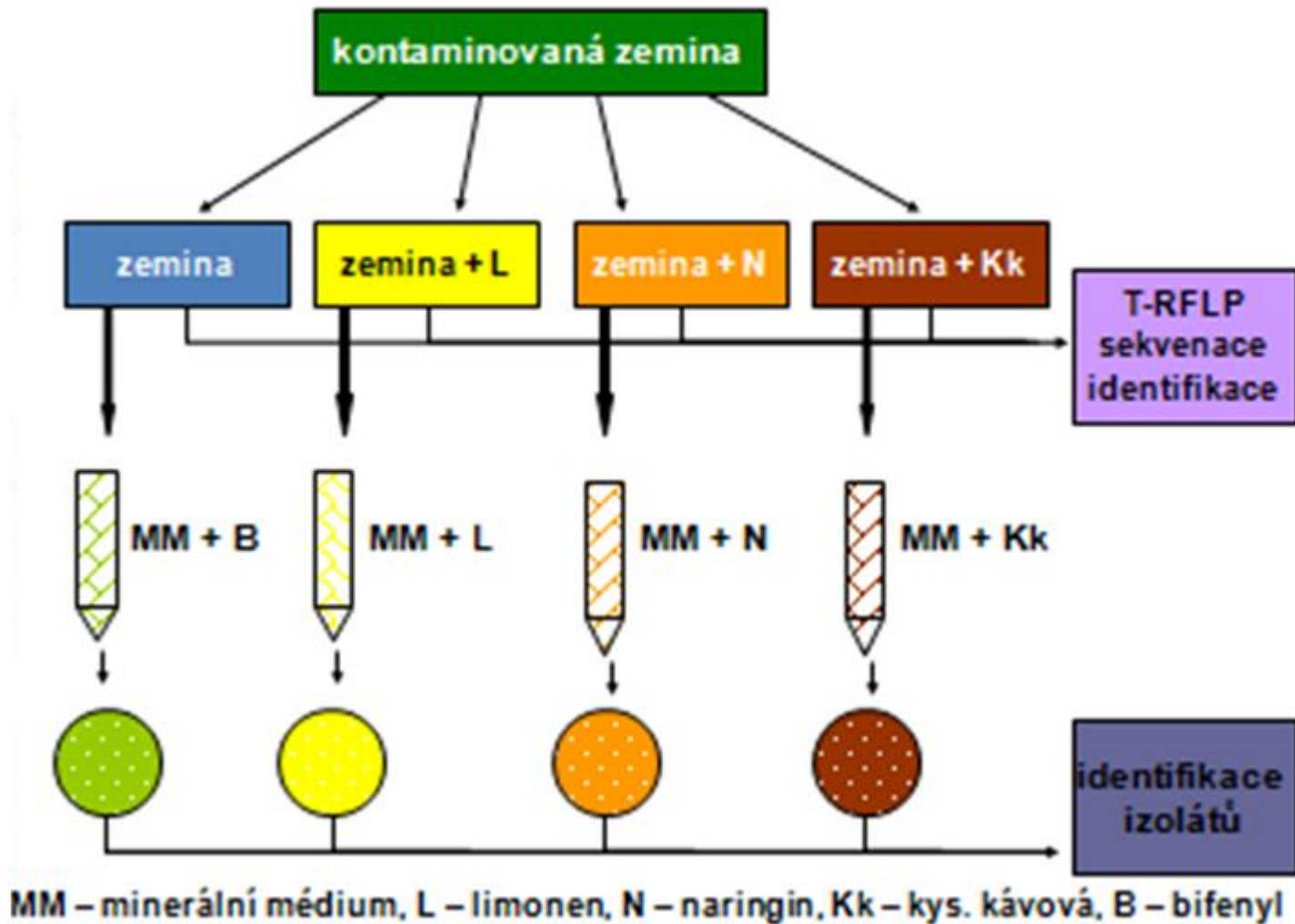
- regulaci vztahů mezi rostlinami a ostatními organismy
- výskyt např. v exudátech nebo plodech
- mohou být metabolizovány jako zdroj uhlíku a vést k nárůstu populací mikroorganismů schopných degradace PCB



# Cíle

- nabohacení široké skupiny mikroorganismů s potenciální schopností degradace PCB
- izolovat mikroorganismy a jejich další studium na degradační schopnosti a případné speciální vlastnosti odlišné od již popsanych kmenů

# Schéma experimentu



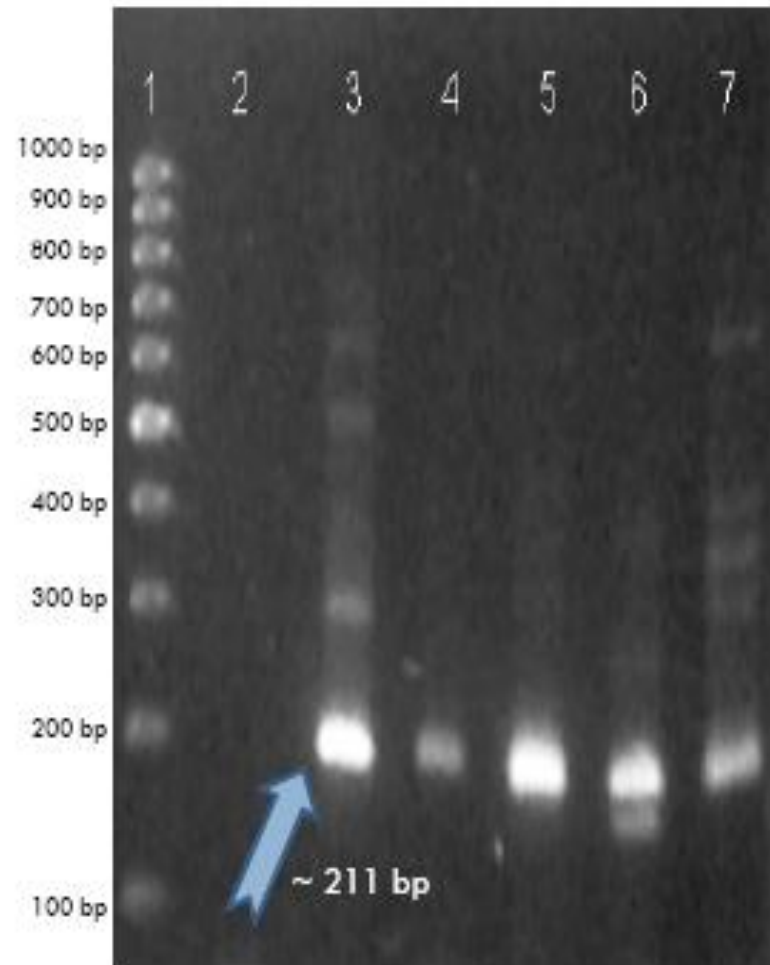


# Příprava zeminy

- 30 g homogenizované zeminy
- přidavek 60 mg sekundárního metabolitu v roztoku minerálních solí
- opakovaná aplikace po 3 – 5 dnech po dobu 8 týdnů

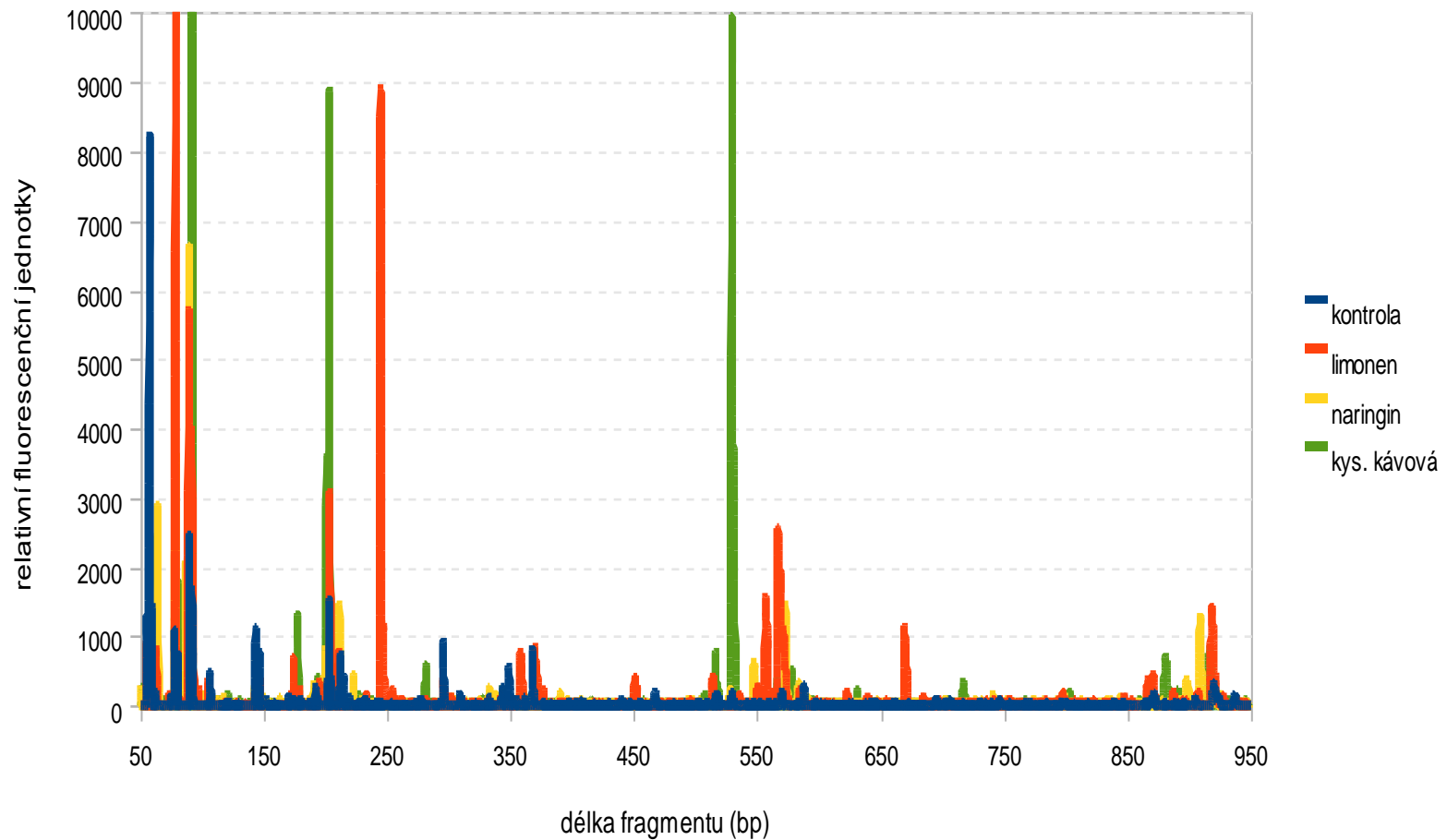
# Přítomnost genů pro BphA

- Nested PCR
  - PCR I – f352, r1178
  - PCR II – f462, r674
- 1 – 100 bp marker
- 2 – negativní kontrola
- 3 – pozitivní kontrola LB400
- 4 – kontrola
- 5 – limonen
- 6 – naringin
- 7 – kyselina kávová



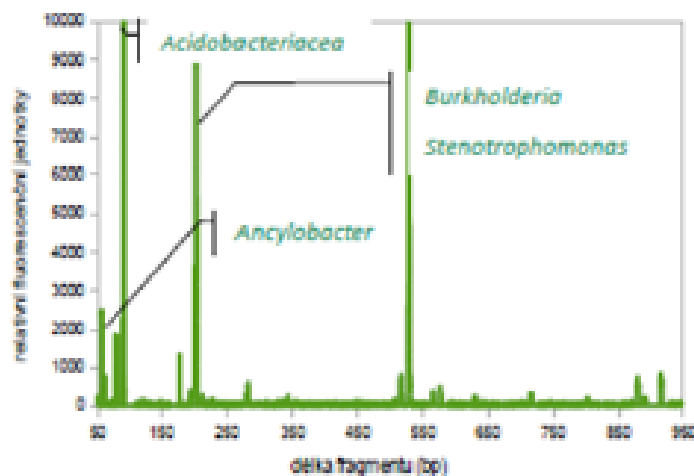
# T-RFLP

## T-RFLP profily zemin

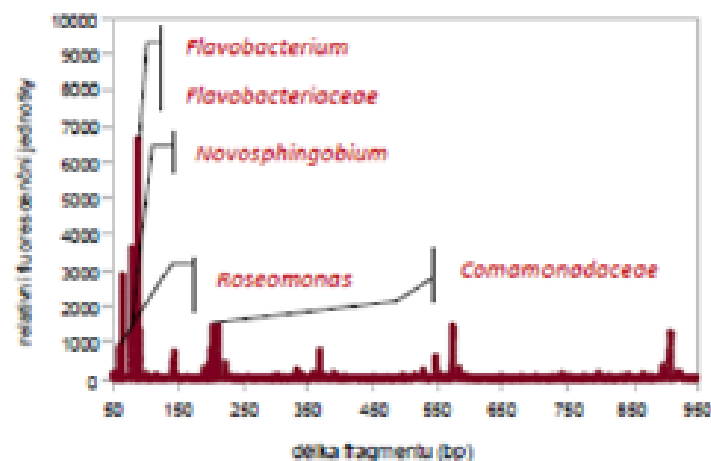


# T-RFLP

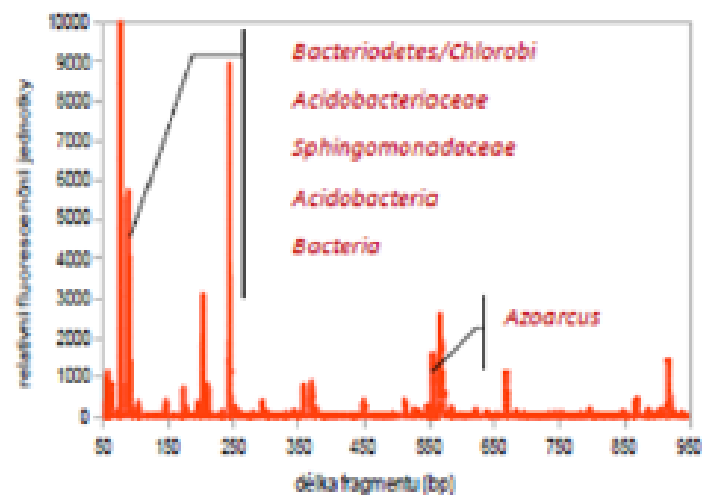
Zemina s přídavkem kys. kávové



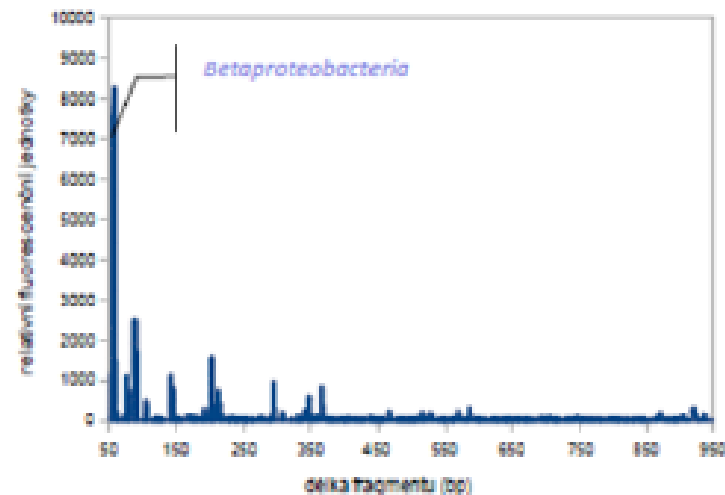
Zemina s přídavkem naringinu



Zemina s přídavkem limonenu



Kontrolní zemina



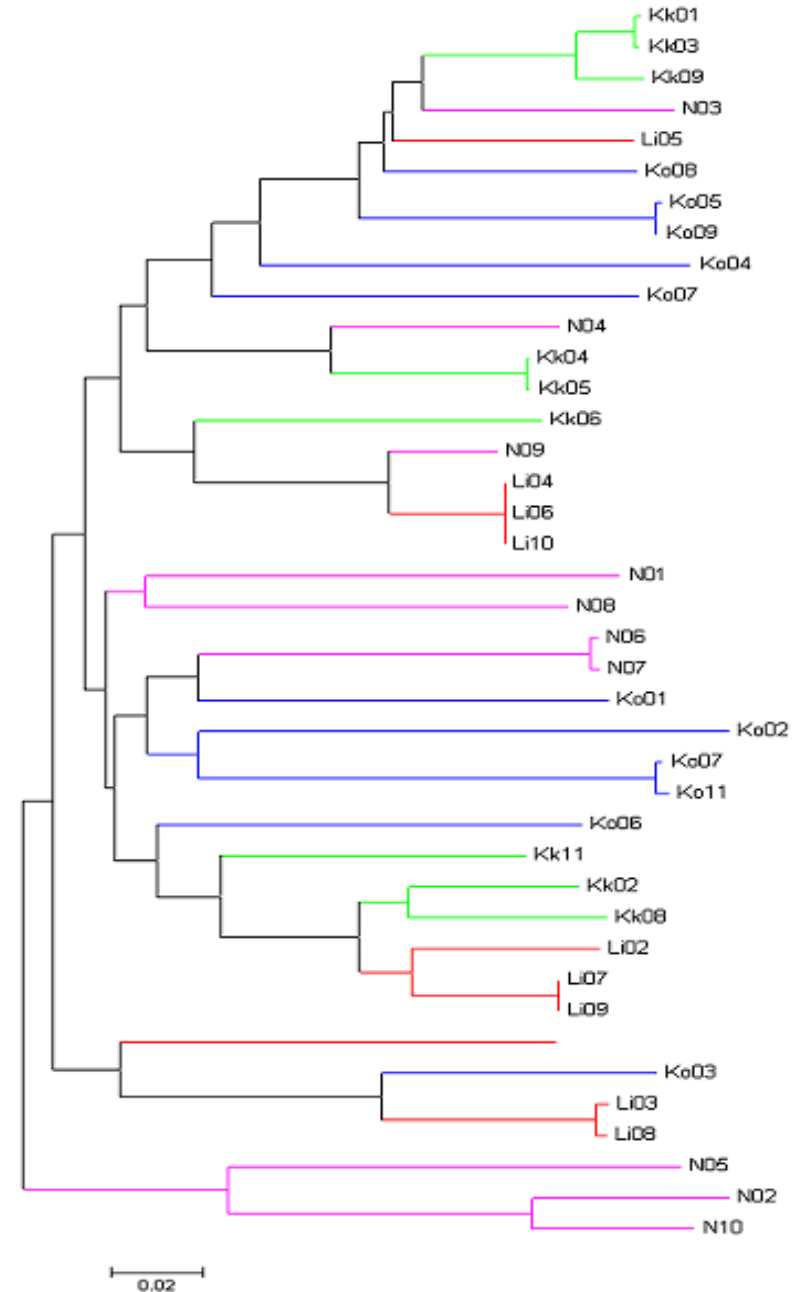
# Fylogenetický strom

---- kys. kávová

---- limonen

---- naringin

---- kontrola



# Nabohacovací kultivace

- odebrání vzorků po ukončení aplikace sekundárních metabolitů
- pasážování jednou týdně po dobu 5 měsíců
- izolace jednotlivých kmenů ze směsných kultur
  - celkem 31 izolátů
- identifikace izolátů - seknevance genů pro 16S rRNA a MS MALDI-TOF

# Identifikace izolátů

Tab. 1: Izoláty nabohacované bifenylem

Izolát	MS MALDI	Skóre	Sek venace
Ko4y	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	++	<i>Stenotrophomonas</i>
Ko5y	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	++	<i>Stenotrophomonas</i>
Ko5w	<i>Enterobacter</i>	+	<i>Enterobacter</i>
Ko6	<i>Stenotrophomonas</i>	++	<i>Stenotrophomonas</i>
Ko7w	<i>Enterobacter cloacea</i>	++	<i>Enterobacter</i>
Ko7wk	<i>Enterobacter</i> sp.	+++	<i>Enterobacter</i>
Ko7y	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	++	<i>Stenotrophomonas</i>
Ko9m	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	++	<i>Stenotrophomonas</i>
Ko9v	<i>Enterobacter</i> sp.	+++	<i>Stenotrophomonas</i>

# Identifikace izolátů

Tab. 2: Izoláty nabohacované limonenem

Izolát	MS MALDI	Skóre	Sekvence
L1y	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+++	<i>Stenotrophomonas</i>
L1y0	<i>Pseudomonas</i>	+	<i>Pseudomonas</i>
L2w	<i>Burkholderia</i>	+	<i>Enterobacter</i>
L2y	<i>Pseudomonas geniculata</i>	++	<i>Stenotrophomonas</i>
L3y	nespolehlivá identifikace	-	<i>Pseudomonas</i>
L5w	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+++	<i>Stenotrophomonas</i>
L5y	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	++	<i>Pseudomonas</i>
L5yp	<i>Pseudomonas</i>	+	<i>Pseudomonas</i>
L6	<i>Burkholderia</i>	+	<i>Burkholderia</i>
L8	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	++	<i>Pseudomonas</i>



# Identifikace izolátů

Tab. 3: Izoláty nabohacované naringinem

Izolát	MS MALDI	Skóre	Sekvenace
N4	<i>Pandorea norimbergensis</i>	++	<i>Pandorea</i>
N5	nespolehlivá identifikace	-	<i>Burkholderia</i>
N7	<i>Pandorea norimbergensis</i>	++	<i>Pandorea</i>
N9	nespolehlivá identifikace	-	<i>Burkholderia</i>
N10	<i>Pandorea norimbergensis</i>	++	<i>Pandorea</i>

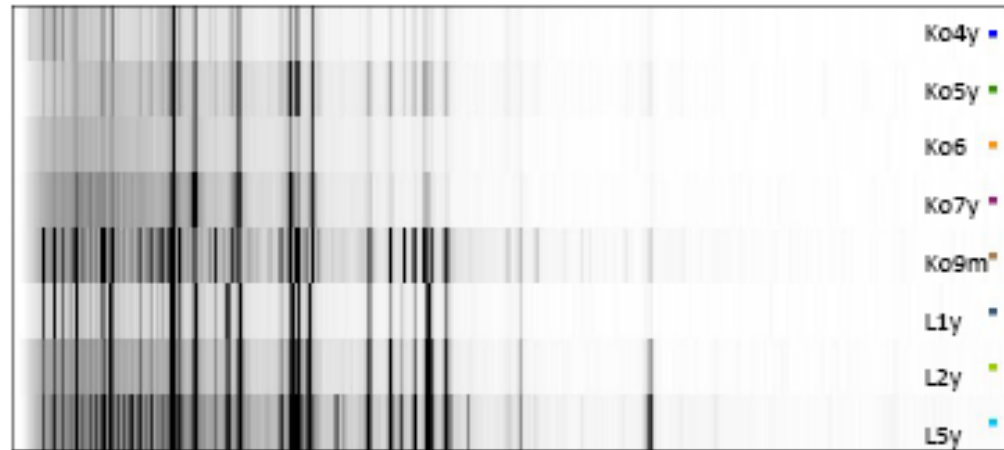
# Identifikace izolátů

Tab. 4: Izoláty nabohacované kyselinou kávovou

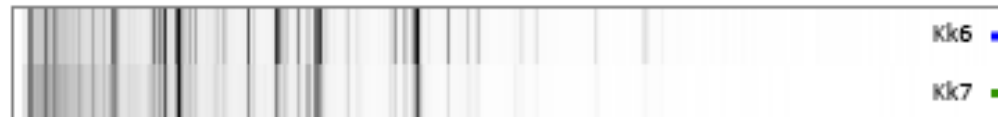
Izolát	MS MALDI	Skóre	Sekvenace
Kk1	nespolehlivá identifikace	-	<i>Novosphingobium</i>
Kk5	nespolehlivá identifikace	-	<i>Novosphingobium</i>
Kk6	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	++	<i>Rhizobium</i>
Kk7	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	+	<i>Rhizobium</i>
Kk8	<i>Pseudomonas putida</i>	++	<i>Pseudomonas</i>
Kk9	<i>Pseudomonas putida</i>	++	<i>Enterobacter</i>
Kk10	nespolehlivá identifikace	-	<i>Novosphingobium</i>

# Porovnání spekter MS MALDI-TOF podle rodové identifikace

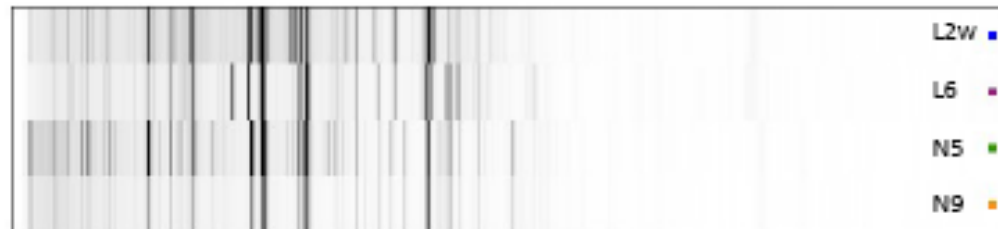
*Stenotrophomonas*



*Agrobacterium*

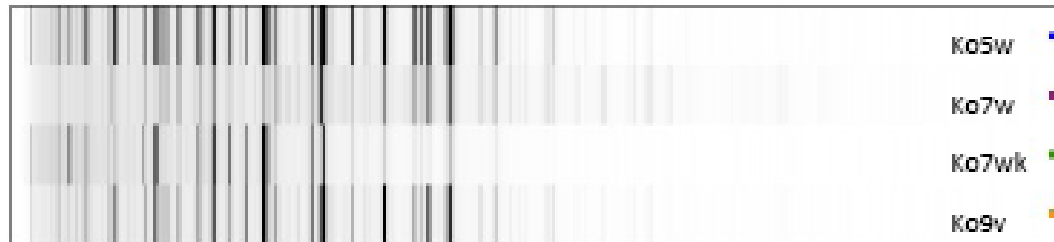


*Burkholderia*



# Porovnání spekter MS MALDI-TOF podle rodové identifikace

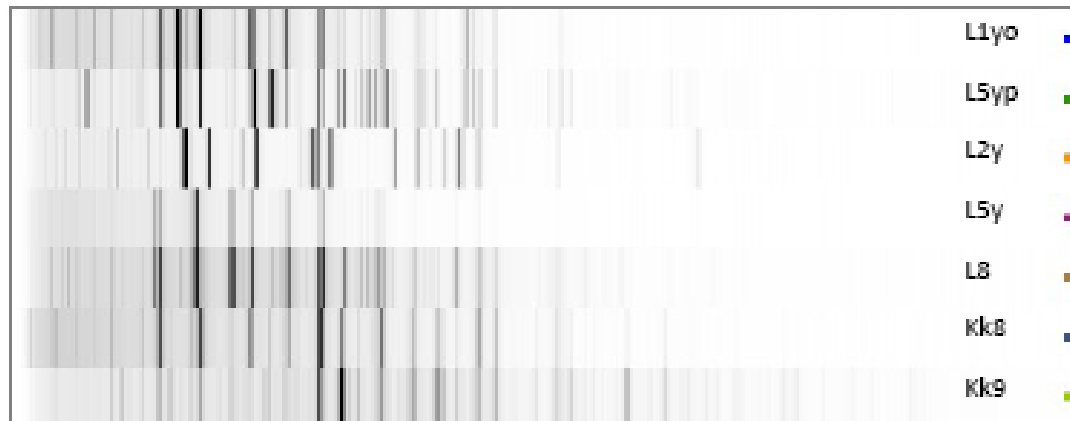
*Enterobacter*



*Pandorea*

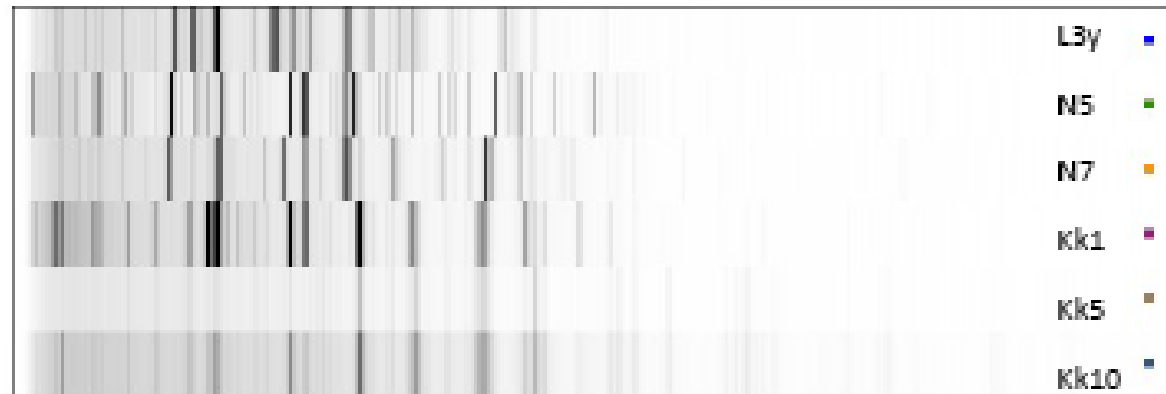


*Pseudomonas*



# Porovnání spekter MS MALDI-TOF podle rodové identifikace

neidentifikováno



# Děkuji za pozornost.

- Práce byla financována granty MŠMT NPV II 2B06156 a 2B08031