



Vysoká škola chemicko-technologická v
Praze

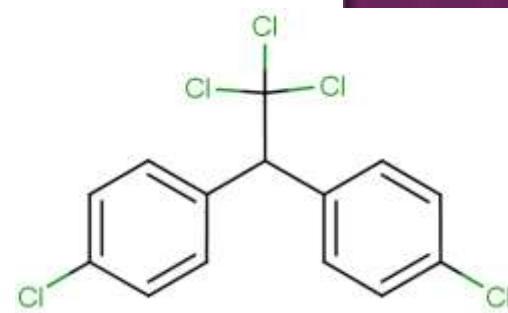
IZOLACE MIKROORGANISMŮ DEGRADUJÍCÍCH CHLOROVANÉ PESTICIDY Z KONTAMINOVANÝCH ZEMIN

Ing. Iva Pacovská
Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT
Praha

CHLOROVANÉ PESTICIDY:

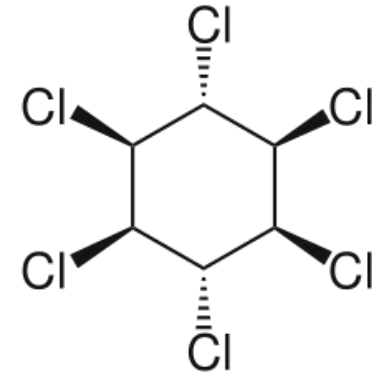
DDT

- ◉ *dichlordifenyiltrichlormethylmethan*
- ◉ Insekticid
- ◉ Bílý krystalický prášek
- ◉ Poprvé syntetizován v roce 1874
- ◉ Především používán k likvidaci komárů a moskytů v tropických zemích - regulace malárie
- ◉ Zakázán ve většině zemí světa
- ◉ V Československu zakázán roku 1974



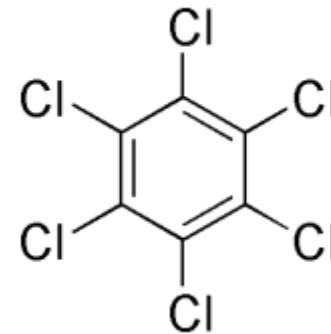
HCH

- 1,2,3,4,5,6 - hexachlorcyklohexan
- Insekticid
- Několik izomerů (α , β , γ , δ)
- γ izomer - lindan, nejúčinnější
- Bílá až nažloutlá látka tvořící vločky
- Užívání regulováno Stockhouskou úmluvou

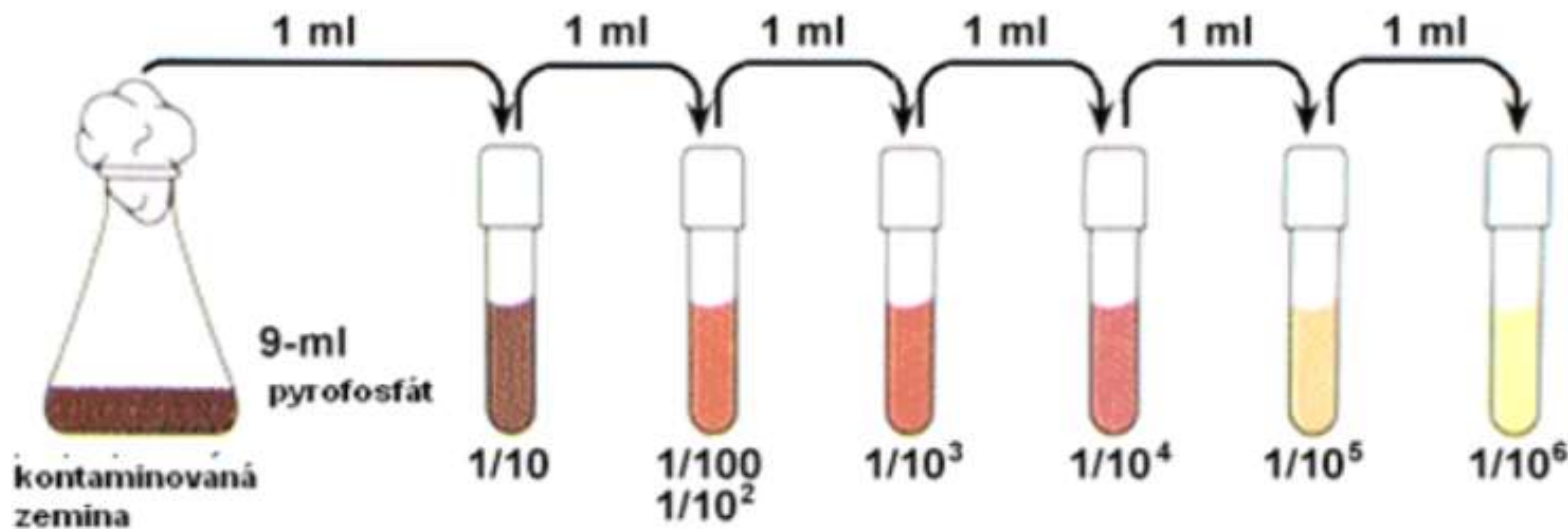


HCB

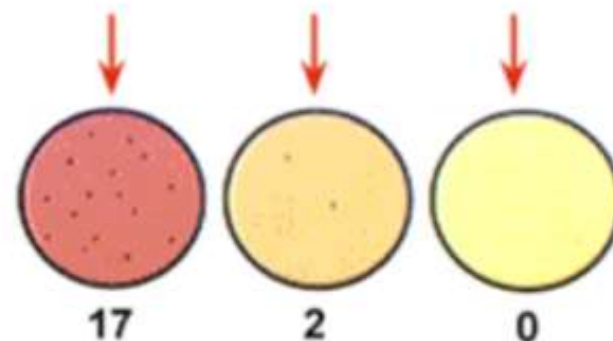
- Hexachlorbenzen
- Fungicid
- Bílá krystalická látka, těkavá
- Vedlejší produkt chemické výroby
- Bílá až nažloutlá látka tvořící vločky
- Užívání regulováno Stockhouskou úmluvou



PRINCIP IZOLACE MIKROORGANISMŮ



analyt (mg/kg sušiny)	H1	H2	H3	HA	NE
DDT	1,513	1,442	11,673	0,012	9,5
HCB	0,029	0,01	1,027	0,01	38,1
LINDAN	0,052	0,063	96,51	0,023	261,5
Zn	4695	6205	344	86,91	3550
Cu	282,2	250	818	42,46	255
Pb	97,4	123,6	110	<1	38820
As	29,5	18,5	7727,9	2790	21

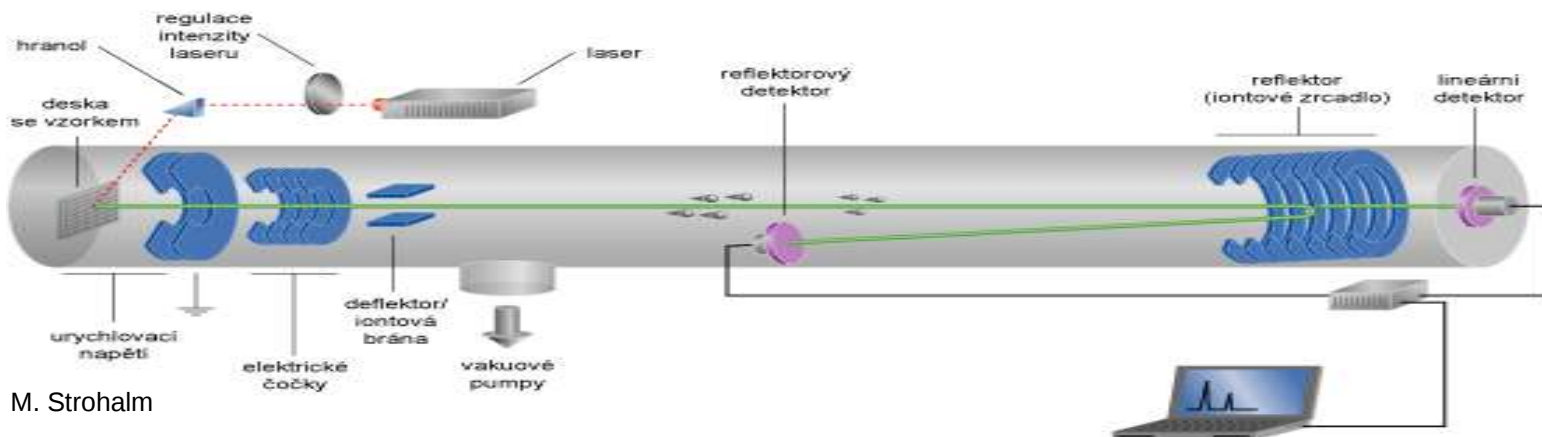


Kultivace na PCA a MM s toxikantem

Vzorky (H1, H2) byly získány z Klatov. Vzorek H3 pochází ze Strakonice a vzorek NE byl získaný z oblasti závodu Spolana Neratovice. Vzorky HA jsou získány z kalu čištění odpadních vod Hájek

ZPŮSOBY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ

- Metoda MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - time of flight) - Identifikace na základě shodnosti molekulových hmotností specificky štěpených ribozomálních proteinů (databáze Maldi Biotyper (v. 1.2))
- Sekvenace 16S rRNA genu (databáze Ribosomal database project)



Izolát	Identifikace metodou MALDI-TOF	Identifikace metodou sekvenace 16S rRNA genu
NE6	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>
H23	neidentifikováno	<i>Rhodococcus</i> sp.
NE18	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
HA4	neidentifikováno	<i>Aeromonas</i> sp.
H16	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>

PROVĚŘENÍ SCHOPNOSTI RŮSTU ISOLOVANÝCH KMENŮ V PŘÍTOMNOSTI XENOBIOTIKA METODOU BIOSCREEN

- Bakteriální suspenze kultivovány s xenobiotikem v mikrodestičce v různých typech médií (LB, MM)
- Turbidimetrické měření optické hustoty v různých časových intervalech při 400 - 580 nm

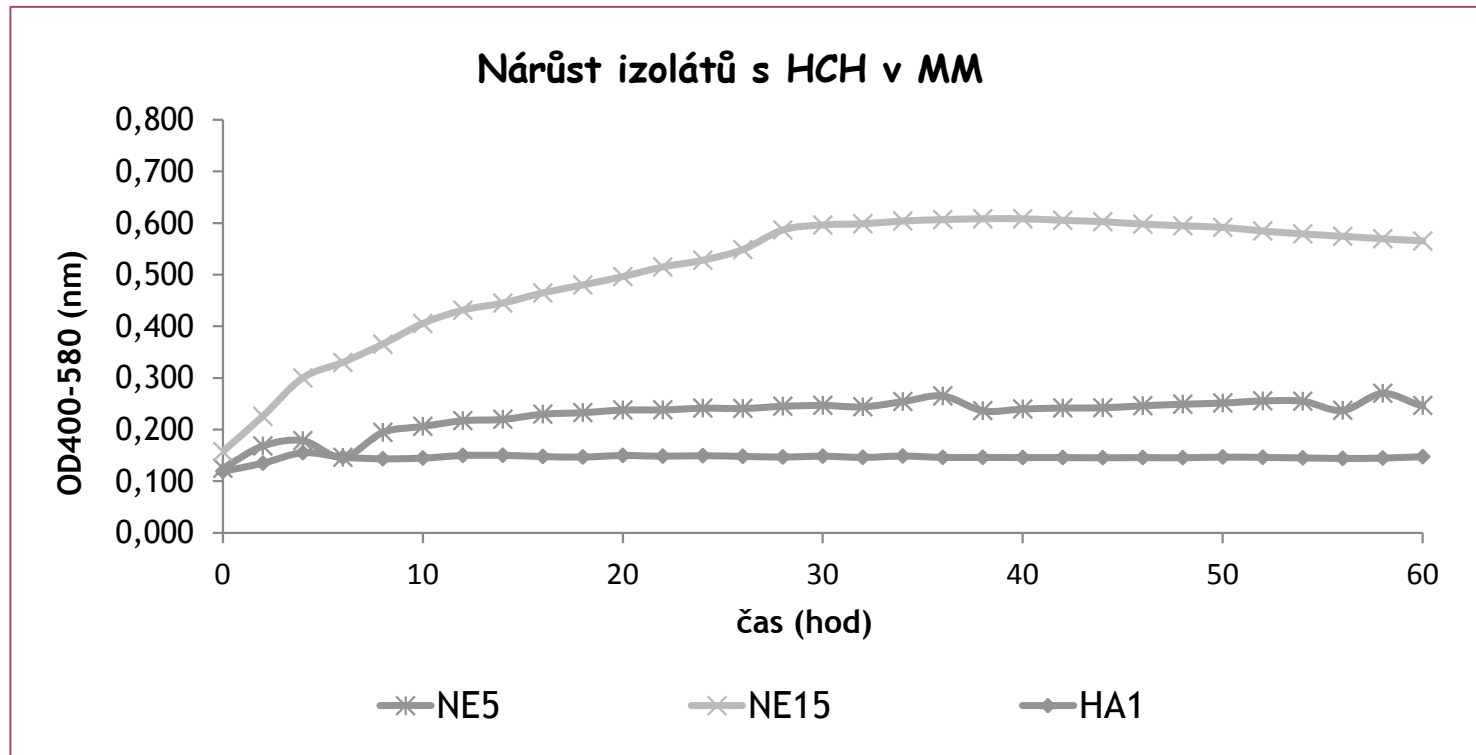


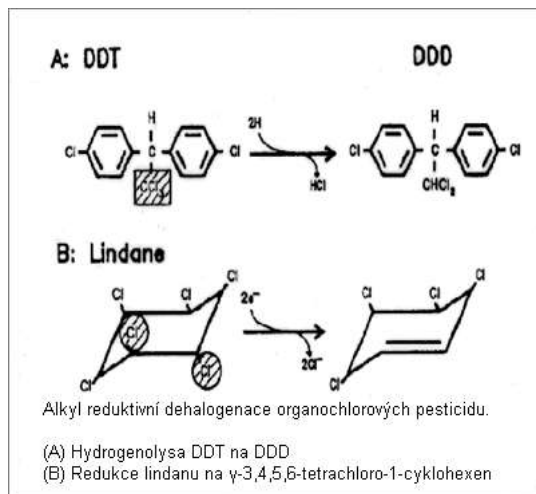
SCHÉMA DEGRADAČNÍHO POKUSU

2 ml suspence isolátu
 $OD_{560} = 2$
v MM
+
PESTICID (5mg/l)

5 paralel
kontrola
-20°C

5 paralel kultivace
10 dnů
lab. teplota

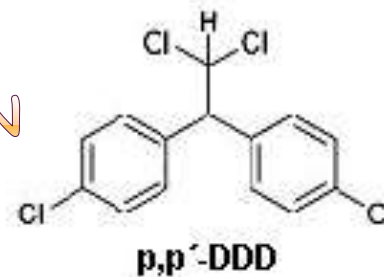
Analýzy
GS-MS



VÝSLEDKY DEGRADAČNÍCH POKUSŮ U NĚKTERÝCH IZOLÁTŮ

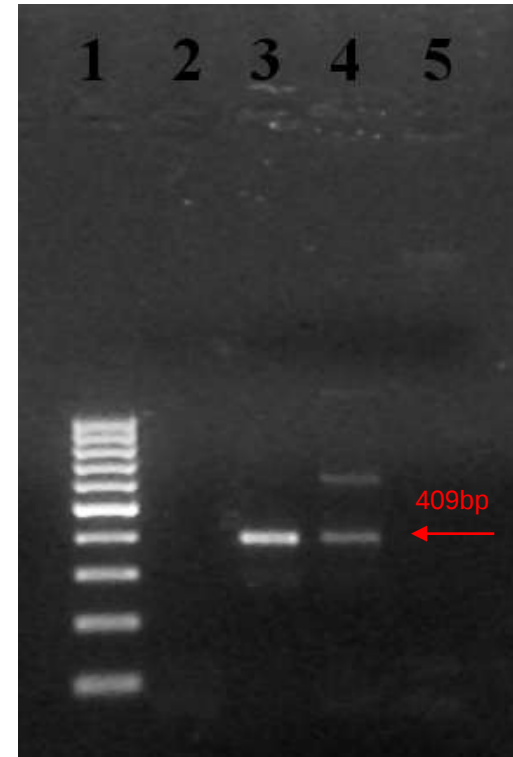
Izolát	Identifikace	Degradace HCH (%)	Degradace DDT (%)	Degradace HCB (%)
H1D7	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	17,3 ±10%	26,7±10%	34,9±10%
H16	<i>Bacillus pumilus</i>	27±10%	19,6±10%	22,3±10%
NE15	<i>Bacillus cereus</i>	19,4±10%	32,7±10%	7,4±10%

U DEGRADACE DDT BYL DETEKOVÁN
METABOLICKÝ PRODUKT DDD



OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI DEGRADAČNÍ HO GEN U *linA*

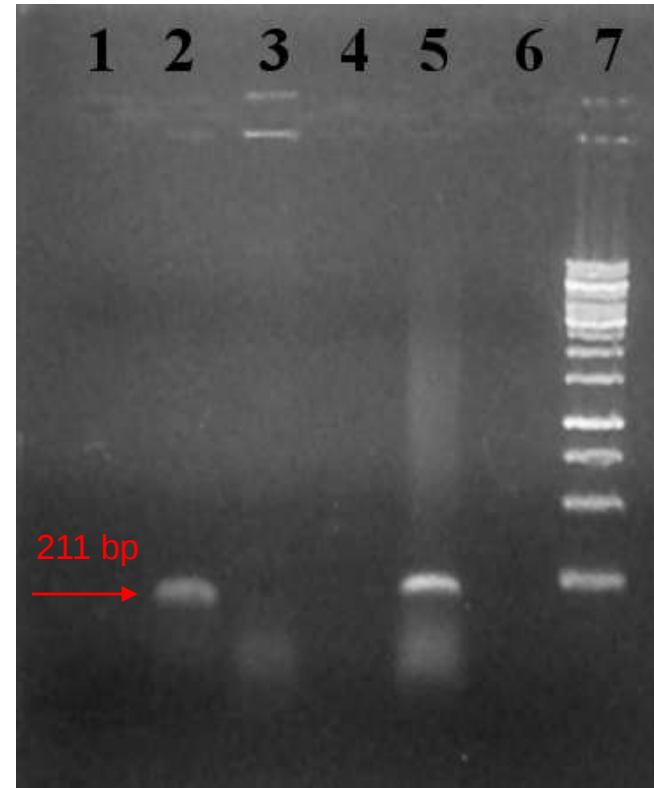
- První enzym degradační dráhy HCH - dehydrochlorinasa
- Primery navrženy pro rod *Sphingobium*
- primery: FwlinA2 a RevlinA2
- U jednotlivých izolátů nebyl tento gen detekován
- Gen *lin A* byl detekován v kontaminované zemině z Neratovic



Popis drah: 1: 100 bp marker, 2: NK, 3: PK, 4: K, 5: S,
PK: *Sphingobium francense*, NK: voda, K:
kontaminovaná zemina z Neratovic, S: zahradnický
substrát

OVĚŘENÍ PŘÍTOMNOSTI DEGRADAČNÍ HO GENU *bphA*

- ◉ *bphA* gen bifenylového operonu kódující enzym bifenyl -2,3-dioxygenasa
- ◉ Enzym přítomen v degradační dráze PCB i první krok degradace DDT
- ◉ Gen byl detekován u tří izolátů (HZI, HA8 a NE19)
- ◉ primery - F463 a R674

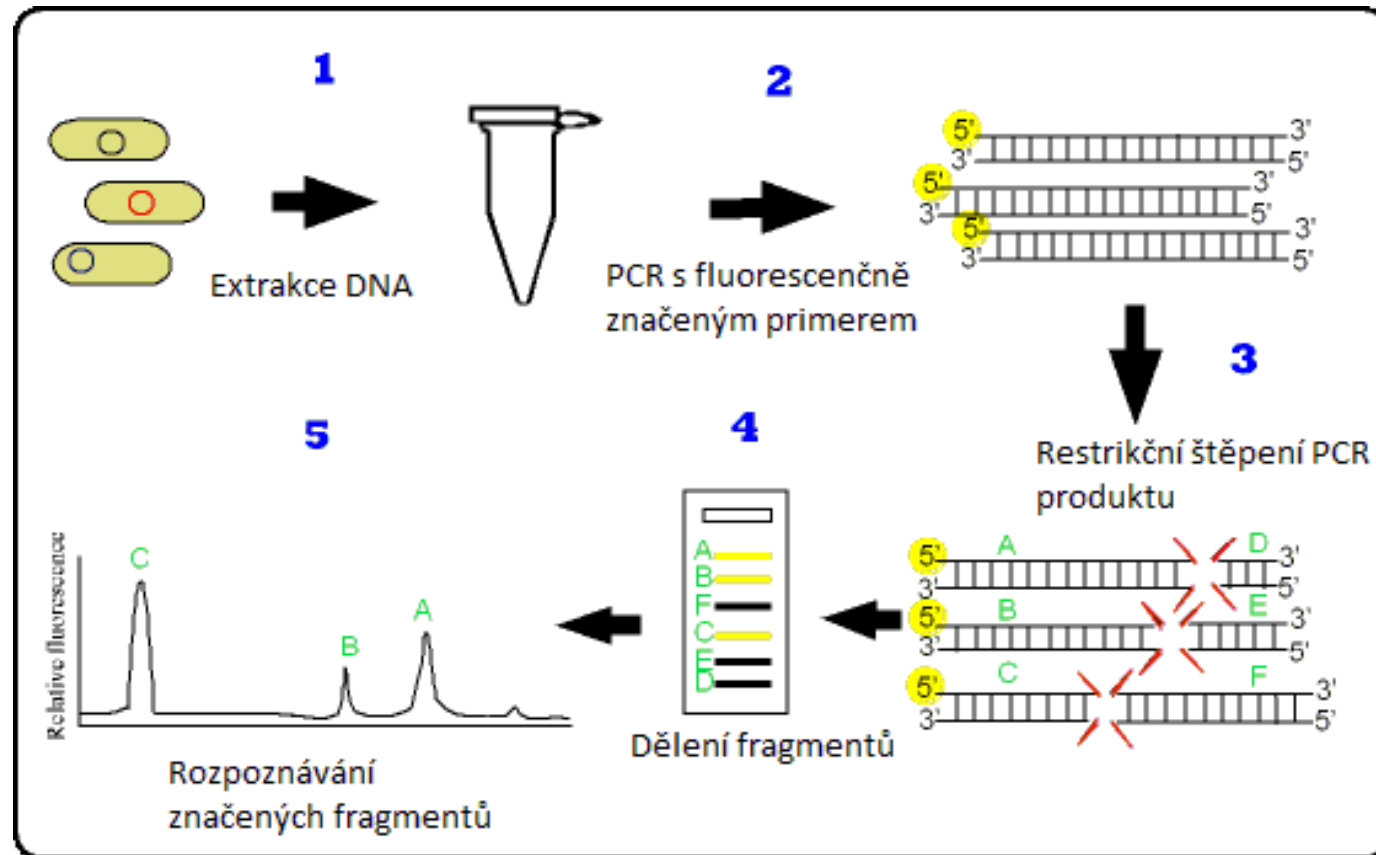


1: HOR, 2: HZI, 3: H1D7, 4: H211a, 5: Positivní kontrola,
6: Negativní kontrola, 7: 1kb standard, PK:
Pseudomonas sp. JAB1, NK: voda, H1D7:
Stenotrophomonas sp., HOR: *Bacillus subtilis*, HZI:
Bacillus sp., H211a: *Bacillus pumilus*

STUDIUM ZMĚNY MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY VLIVEM ORGANOCHLOROVANÝCH PESTICIDŮ

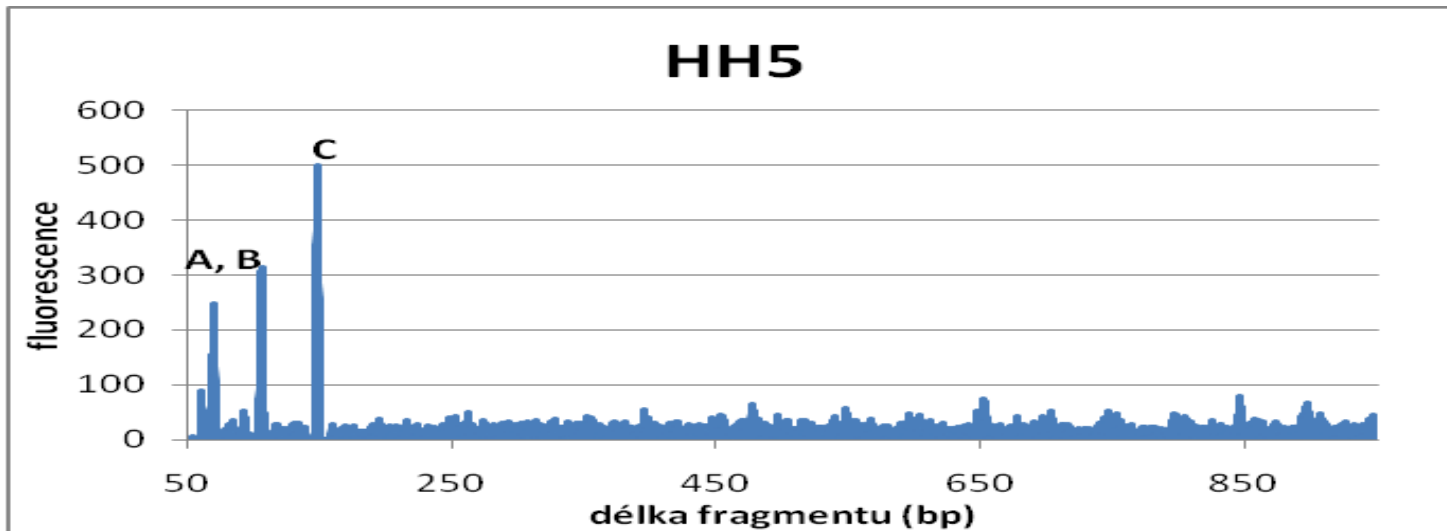
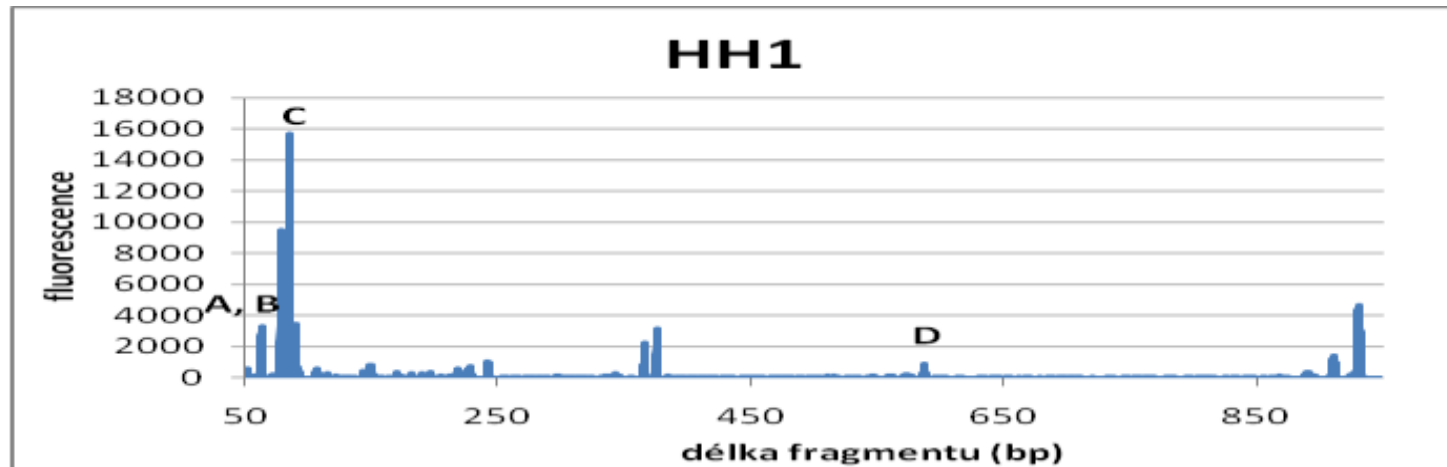
- ◉ Diversita: je různorodost života ve všech jeho formách
- ◉ Příprava vzorků selekčním tlakem:
 - Kultivace zeminy v minerálním médiu s přidavkem pesticidu
 - Po 14 dnech bylo provedeno přeočkování do nového média
- ◉ Pro studium diverzity se používají metody:
 - T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
 - TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
 - TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
 - DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
 - SIP (Stable isotope probing)

T-RFLP



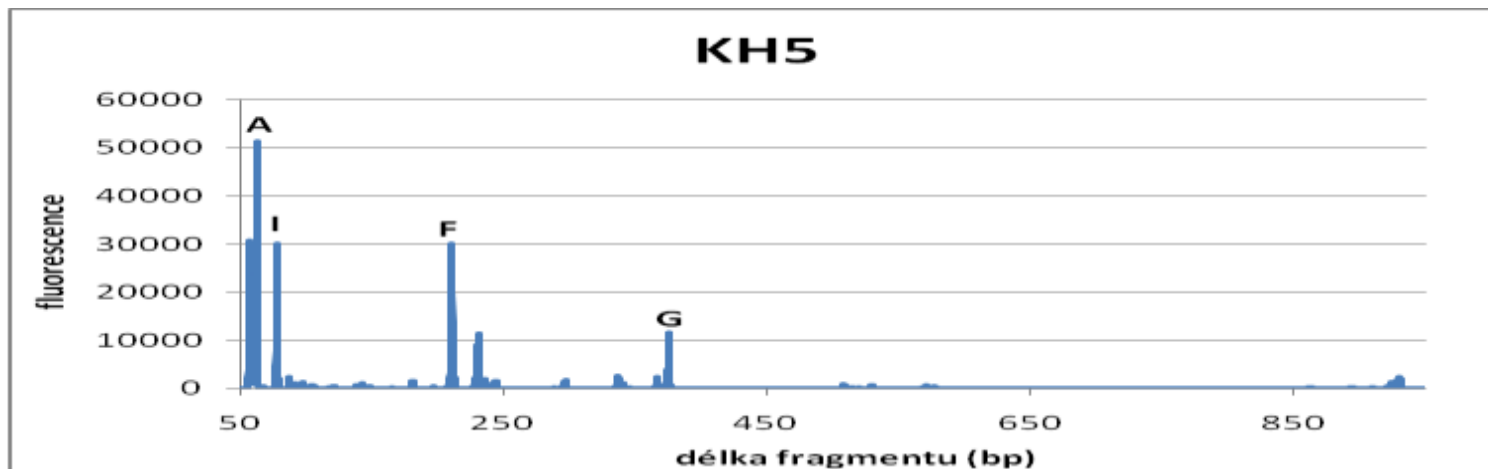
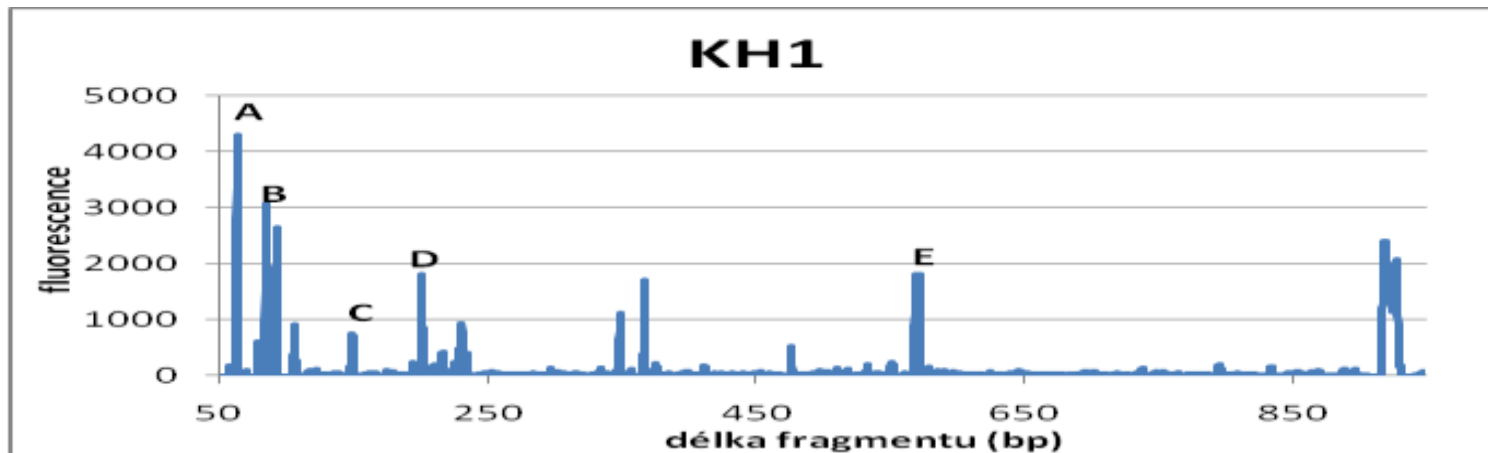
- Primery: 8F-FAM (fluorescenčně značený produkt), 926R
- Štěpení restriční endonukleasou HhaI

T-RFLP - PROFILY



- T-RFLP profily konsorcia HH; A: *Terrimonas*, B: *Dokdonella*, C: *Sphingobium*, D: *Pseudomonas*
- Výluh HH1 - Kontaminovaná zemina s HCH, první pasáž (2 týdne), HH5 - pátá pasáž (10 týdnů)

T-RFLP - PROFILY



- T-RFLP profily konsorcia KH; T-RFLP profil konsorcia KH1; A: *Terrimonas*; B: *Sphingobium*; C: *Chitinophagaceae*; D: *Cupriavidus*; E: *Pseudomonas*; F: *Hyphomicrobiaceae*; G: *Pseudoxanthomonas*; I: *Dokdonella*
- Výluh KH1 - Zahradní substrát s HCH, první pasáž (2 týdne), KH5 - pátá pasáž (10 týdnů)

ZÁVĚR

- ◉ Selekčním tlakem bylo získáno 55 bakteriálních izolátů
- ◉ 17 kmenů nebylo rodově příbuzných
- ◉ Některé izoláty prokázaly schopnost degradace vybraných pesticidů
- ◉ Nejlepší schopnost degradace HCH izolát H16 (*Bacillus pumilus*, 27%), DDT izolát NE15 (*Bacillus cereus*, 33 %), HCB izolát H1D7 (*Stenotrophomonas sp.* 35 %)
- ◉ U degradace DDT byl detekován produkt DDD

ZÁVĚR

- ◉ Degradační gen *linA* pro HCH byl detekován pouze v kontaminované zemině
- ◉ Primery byly specificky navrženy pro rod *Sphingobium*
- ◉ Degradační gen *bphA* byl detekován u izolátů (HZI, HA8, NE19)

ZÁVĚR

- ◉ Změny mikrobiální diverzity způsobené vlivem selekčního tlaku jednotlivých pesticidy byla sledována metodou T-RFLP.
- ◉ Diverzita u výluhů z kontrolní zemina (zahradnický substrát) byla vyšší, avšak byla velmi negativně ovlivněna v časovém horizontu použitými organochlorovými pesticidy.
- ◉ Diverzita vodných výluhů z kontaminované zeminy (Neratovice) měla nižší diverzitu, která se selekčním tlakem v průběhu pokusů téměř neměnila.

Děkuji za pozornost

Na práci spolupracovali Ing. Petra Lovecká, Ph.D.;
Ing. Jan Vondráček;
Ing. Petr Štursa; Ing. Ondřej Uhlík, Ph.D.