

IZOLACE BAKTERIÍ ROZKLÁDAJÍCÍCH CIZORODÉ NEBO TOXICKÉ ORGANICKÉ LÁTKY

1. Princip izolace

Všechny chemoorganotrofní bakterie vyžadují pro svůj růst uhlíkatý zdroj ve formě určitých organických sloučenin. Nejvhodnějšími substráty jsou pro většinu z nich sacharidy, bílkoviny a bílkovinné deriváty, aminokyseliny, organické kyseliny a jejich soli, i vícesytné alkoholy. Je to dáno tím, že enzymy, potřebné k rozkladu a využití (utilizaci) těchto sloučenin, jsou mezi bakteriemi široce rozšířeny. Některé druhy či skupiny bakterií však mají k dispozici i enzymový aparát pro rozklad (degradaci) látek méně běžných (např. pro utilizaci vosků, některých uhlovodíků, těžce rozložitelných polysacharidů apod.) a v posledních letech je nacházena celá řada bakterií rozkládajících i některé látky syntetické. Může to být dáno buď strukturální podobností těchto syntetických látek s některými přírodními sloučeninami, nebo jde o rozklad na základě kometabolismu a nelze vyloučit ani evoluci nových enzymů.

Základní princip získávání degradačních bakterií není nijak složitý. Je možné je vykultivovat z vhodných vzorků (viz níže) použitím definovaných minerálních živných médií, obohacených jedinou organickou sloučeninou - danou cizorodou látkou. V takových živných prostředích mohou růst a množit se jedině ty buňky, které mají schopnost jejího využití (pokud reálně existují).

2. Výběr vzorků a jejich zpracování

Vhodným materiálem pro izolaci bakterií s degradačními schopnostmi jsou vzorky s bohatým zastoupením mikroorganismů, jako jsou půdy, sedimenty či kaly. Zvýšený výskyt hledaných bakterií lze očekávat především tam, kde se vyskytují látky strukturálně podobné cizorodým, nebo v prostředí s dlouhodobou přítomností cizorodých látek. V takových místech totiž již proběhla (či probíhá) potřebná selekce mikroorganismů. Výbornými zdroji degradačních kultur jsou proto zejména zeminy či znečištěné vody dlouhodobě kontaminované ropnými produkty, rozpouštědly nebo opakovaně zatěžované pesticidy, a aktivované kaly z průmyslových a některých městských čistíren odpadních vod.

V některých případech je počet bakterií s potřebnými vlastnostmi dostatečný pro přímé očkování vzorků nebo jejich výluhů na pevná živná média. Častěji se však provádí pomnožení vzorků v definovaném tekutém prostředí (minerální látka + organická cizorodá látka) a teprve pak izolace na pevných agaroch.

Způsob vnesení cizorodých látek do živných půd musí respektovat jejich charakter, navíc některé mohou být termolabilní a nemusí snášet sterilizaci teplem. Nerozpustné látky mohou být aplikovány v jemných

krystalcích nebo v suspensi, těkavé sloučeniny v parách. Protože při bakteriálním rozkladu látek (např. uhlovodíků nebo některých polymerů) většinou klesá pH prostředí, bývá někdy účelné při vlastní izolaci na pevných médiích doplnit složení média o indikátor pH a tak zvýraznit kolonie, schopné rozkladu.

3. Zadání úlohy

Ze vzorku kalu či zeminy izolujte bakterie schopné rozkladu vybraných rozpouštědel (**toluenu**, xylenu, benzínu aj., dle zadání vedoucího), **fenolu** a případně i jiných obtížně rozložitelných látek.

4. Laboratorní úkoly

Úkol č. 1: Příprava živných půd a sterilních pomůcek

Připravte 200 ml sterilního minerálního agaru s BTM a rozlejte po 15 ml:

- do 3 petriho misek s 0,4 ml zásobního roztoku fenolu (10 g/l)
- do 3 petriho misek s 1,2 ml zásobního roztoku fenolu (10 g/l)
- do 4 skleněných petriho misek bez přídavku organické látky

Připravte 100 ml sterilního universálního živného agaru (např. TYA) a rozlijte do 6 petriho misek.

Vypočtete aktuální koncentrace fenolu ve fenolových agarech na základě koncentrace zásobního roztoku fenolu (10 g/l) a jeho dávkování do minerálních agarů

5. Postup

Vzorek aktivovaného kalu desintegrujte 5 – 10 minut skleněnými kuličkami.

Ze vzorku kalu naočkujte na každý druh fenolového agaru 10 µl suspence a rozetřete sterilní skleněnou hokejkou. 10 µl suspence naočkujte také na minerální agar.

Ze vzorku kalu naočkujte na minerální agar ve skleněné misce 500 µl suspence, rozetřete sterilní skleněnou hokejkou, nechte opatrně odsušit a umístěte do exsikátoru s kádinkou obsahující cca 10 ml toluenu.

Ze vzorku kalu naočkujte na minerální agar 500 µl suspence, rozetřete sterilní skleněnou hokejkou a nechte opatrně odsušit.

Petriho misky inkubujte při 20 - 25°C 5 – 7 dnů a poté srovnejte růst kolonií na minerálních agarech a na agarech s fenolem/toluenem. Vybrané kolonie přeočkujte na minerální agary s příslušnou fenolickou látkou, případně na universální agary (TYA) pro získání čistých kultur. Počet přeočkování proveďte dle potřeby. Vše provádějte dle konzultace s učitelem.