

# VYUŽITÍ MIKROORGANISMŮ K ROZKLADU CIZORODÝCH NEBO TOXICKÝCH LÁTEK

---

## 1. Úvod

Některé mikroorganismy jsou schopné využívat člověkem vyrobené sloučeniny jako zdroje své výživy, a to buď jako zdroje uhlíku a energie (ropné produkty, fenolické látky, některé pesticidy) nebo dusíku a jiných minerálních prvků (kyanidy, sírné sloučeniny). Tyto mikroorganismy jsou tak činiteli rozkladu těchto látek v půdách, vodách, sedimentech i kalech a mohou být využitelné pro jejich cílené odstraňování z kontaminovaných míst. Mezi mikrobiálně rozložitelné cizorodé látky patří především takové sloučeniny, jejichž struktura se podobá některým přírodním sloučeninám a mohou tak být substrátem pro některé mikrobiální katabolické enzymy.

Fenolické látky jsou typickým příkladem takových látek, neboť se v přírodě běžně vyskytují (aromatické aminokyseliny, některé hormony, rostlinné flavonoidy a barviva, lignin a mnohé další sloučeniny), takže v průběhu evoluce došlo k vývoji řady mikrobiálních katabolických enzymů, pro něž mohou být substrátem i četné (byť ne všechny) synteticky vyráběné deriváty. Klíčovým faktorem pro případný mikrobiální rozklad syntetických fenolů je tak aktuální koncentrace těchto sloučenin v prostředí, protože jde často o toxické látky, které mohou mikrobiální buňky poškozovat nebo zabíjet. Proto je u mikrobiálních kultur, připadajících do úvahy pro praktické využití, vždy potřebné zjištění o koncentracích fenolů, při kterých jejich růst nastává, a také zda rozklad fenolů není omezen při současné přítomnosti jiných organických substrátů.

Podobným příkladem mikrobiálního rozkladu syntetických sloučenin je biodegradace některých polymerních materiálů. I když velká většina dnes nejvíce vyráběných syntetických polymerů je jen velmi obtížně mikrobiálně rozložitelná až téměř nerozložitelná (polypropylen, polystyren, polyethylen, polyvinylchlorid, polyethylentereftalát aj.), přesto některé podléhají mikrobiálnímu rozkladu a mohou sloužit určitým druhům mikroorganismů jako zdroje uhlíku a energie. Mezi takové materiály patří polyvinylalkohol, polykaprolakton, alifatické polyestery a také některé polyethylenglykoly. I zde se částečně uplatňuje vliv existence přírodních sloučenin obdobné struktury – polykaprolakton je například rozkládán kutinasou a některými lipasami, syntetické polyestery mají obdobu v přírodních polyesterech různého původu a polyvinylalkohol je rozkládán enzymy podobnými některým typům dehydrogenas a oxidas alkoholů; v případě dehydrogenas za účasti kofaktoru PQQ (pyrrolochinolinchinonu), který degradační bakterie obvykle získávají z vnějšího prostředí (tj. od mikrobiálních symbiontů nebo z rozpadajících se buněk). V četných případech degradací polutantních látek je tedy potřebná přítomnost více druhů mikroorganismů k žádoucímu rozkladu uhlíkatého skeletu, a tak k rozkladu dochází jen v určitých oblastech vnějšího prostředí nebo za určitých podmínek.

## 2. Zadání úlohy

Ověřte růst izolovaných bakteriálních kultur na fenolu (resp. na toluenu) jako jediném organickém substrátu při jeho různých koncentracích. Využijte Vámi získané bakteriální kultury.

Ověřte schopnost bakteriálních kultur rozkládat polyvinylalkohol (PVA) a ověřte význam působení více druhů bakterií.

## 3. Laboratorní úkoly

### **Úkol č. 1: Příprava živných půd a sterilních pomůcek**

Připravte 100 ml minerálního média a vysterilizujte jej:

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (23,9 g/l).....	8 ml
Roztok $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (9,078 g/l).....	2 ml
Voda destilovaná.....	85 ml
Roztok $\text{NH}_4\text{Cl}$ (30 g/l).....	1 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (10 g/l).....	1 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 g/l).....	1 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l).....	1 ml
Roztok stopových prvků .....	0,1 ml

Připravte suspence získaných kultur ve sterilních zkumavkách s 2 ml fyziologického roztoku, případně zásobní roztok fenolu (50 g/l), PVA (10 g/l) a PQQ (0,1 g/l) a rovněž vysterilizujte.

Připravte 5 – 10 ks sterilních vzorkovnic pro práci s těkavými látkami (horkovzdušná sterilizace) a stejný počet uzávěrů s plynotěsnými septy (sterilizace UV zářením).

### **Úkol č. 2: Růst získaných bakteriálních kultur na fenolu**

Pro každou testovanou kulturu připravte 6 sterilních zkumavek, do každé asepticky napipetujte 3 ml sterilního, dobře promíchaného minerálního média a poté přidejte následující objemy zásobního roztoku fenolu a suspensi zkoumané kultury dle následující tabulky:

	Zkumavky s 3 ml minerálního média					
	1	2	3	4	5	6
Zásobní r. fenolu ( $\mu\text{l}$ )	0	15	31	46	62	110
Suspence kultury ( $\mu\text{l}$ )	10	10	10	10	10	10
Koncentrace fenolu (mg/l)	0,0	248	510	752	1009	1763

Naočkované zkumavky inkubujte 7 – 14 dní při 25 - 30°C, růst bakterií hodnotte vizuálně po cca 3 dnech (zákal média v porovnání se zkumavkou č. 1) a případně po skončení kultivace ověřte ve vybraných zkumavkách úbytek fenolu buď pomocí přímého stanovení (spektrofotometrická metoda s aminoantipyrinem) nebo pomocí stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC) po odstranění buněk centrifugací.

### Úkol č. 3: Růst získaných bakteriálních kultur na toluenu

Pro každou kulturu připravte řadu 5 sterilních vzorkovnic (vialek), asepticky napipetujte do každé 5 ml sterilního, dobře promíchaného minerálního média, poté přidejte suspenzi zkoumané kultury a nakonec objemy toluenu 0, 1, 3, 5 a 10  $\mu\text{l}$ ; vialky okamžitě uzavírejte po přidavku toluenu. Kultivujte a hodnotěte stejně jako u kultur rostoucích na fenolu.

### Úkol č. 4: Bakteriální degradace polyvinylalkoholu

Do řady 5 sterilních uzavíratelných zkumavek napipetujte asepticky po 3 ml sterilního minerálního média a poté přidejte následující objemy zásobních roztoků PVA, PQQ a po 10  $\mu\text{l}$  suspense kultury *Sphingomonas* sp. JK2 dle následujícího rozpisu:

	Zkumavky s 3 ml minerálního média				
	1	2	3	4	5
Zásobní r. PVA ( $\mu\text{l}$ )	150	150	150	150	150
Zásobní r. PQQ ( $\mu\text{l}$ )	2	-	-	2	2
Suspense kultury ( $\mu\text{l}$ )	-	10	10	10	10

Po přípravě a zaočkování zkumavek jejich obsah dokonale promíchejte a stanovte vstupní koncentraci PVA pomocí jodometrické mikrometody (viz níže). Inkubaci proveďte na rotační nebo vratné třepačce při teplotě 25°C po dobu 14 dnů. Po 7 dnech kultivace zhodnoťte vizuálně růst bakterií v jednotlivých zkumavkách a po skončení celého pokusu stanovte konečné koncentrace PVA a získané výsledky vyhodnoťte.

#### Jodometrická mikrometoda stanovení polyvinylalkoholu:

20  $\mu\text{l}$  vzorku po odstranění buněk se dávkuje do jamky mikrotitrační destičky a po přidání 42  $\mu\text{l}$  roztoku kyseliny borité (40 g/l) a 10  $\mu\text{l}$  roztoku jódu (12,7 g  $\text{I}_2$  + 25 g KI/l) se ihned měří absorbance při 660 nm na přístroji TECAN. Koncentrace PVA se stanoví na základě kalibrační přímky.