

Interakce mikroorganismů a rostlin v zemině kontaminované PCB a jejich význam při fyto/rhizoremediaci

INTERACTIONS OF MICROBES AND PLANTS AND THEIR IMPORTANCE IN FYTO/RHIZOREMEDIATION IN PCB CONTAMINATED SOIL

Veronika Kurzawová¹, Ondřej Uhlík^{1,2}, Tomáš Macek^{1,2}, Martina Macková^{1,2}

¹VŠCHT v Praze a ²Ústav organické chemie a biochemie AV ČR: Společná laboratoř ÚOCHB a VŠCHT Praha

Polychlorované bifenyly (PCB) jsou organické aromatické sloučeniny, které byly vyráběny chlorací bifenyly, kdy teoreticky mohlo být syntetizováno celkem 209 kongenerů lišících se různým stupněm chlorace a umístěním chloru na bifenylovém jádře. Tyto sloučeniny byly dlouhou dobu používány v průmyslu díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem, jako je tepelná odolnost, rezistence vůči kyselinám i zásadám, lipofilní charakter, špatná rozpustnost ve vodě atd. Důsledkem těchto vlastností je ale také jejich rezistence k vnějším vlivům prostředí, což vede k jejich akumulaci v životním prostředí, odkud se dále dostávají do potravního řetězce. PCB byly z průmyslu vyřazeny poté, co bylo zjištěno, že jsou toxické jak pro lidi, tak pro zvířata. Odstraňování těchto látek z životního prostředí fyzikálně-chemickými postupy je nejen náročné na provedení, ale také velice nákladné a nešetrné k životnímu prostředí. Mnohé živé organismy si však vyvinuly různé detoxikační mechanismy jako obranný systém proti škodlivým účinkům PCB a dalších toxických látek, kterých lze k jejich odstraňování z prostředí využít. Tyto organismy spolu v přírodních podmínkách spolupracují a podporují navzájem své detoxikační schopnosti. Přístupy založené na využití biologických systémů (bioremediace) jsou jedním ze způsobů odstraňování polutantů z životního prostředí. Jejich výhodami je snadná proveditelnost, finanční nenáročnost a především šetrnost k životnímu prostředí a poměrně vysoká akceptovatelnost širokou veřejností. Bioremediace zahrnuje tedy využití mikroorganismů (mikrobiální bioremediace), rostlin (fytofarmakologie) a jejich interakcí. Rostliny jsou schopné snížit množství PCB v zemině několika způsoby. Vedle schopnosti absorbovat PCB (fytoextrakce), rostliny mohou působením enzymů PCB transformovat (fytotransformace) na nefytotoxickou formu a dále je ukládat v pletivech. Uvolňováním produktů sekundárního metabolismu rostliny dále zvyšují aktivitu rhizosférických mikroorganismů, a tím podporují odbourávání PCB rhizosférickou mikroflórou (rhizoremediace). Při výběru rostlin určených k fytofarmakologii je však také důležité určit, zda je rostlina schopna v kontaminovaném prostředí dobře prosperovat, a s tím souvisí studium toxicity různých polutantů (organických sloučenin i těžkých kovů). Jak bylo již výše zmíněno, rhizoremediace je proces využívající mikroorganismy k odstranění polutantů z kontaminované zeminy. PCB mají hydrofóbní charakter, což má za následek jejich adsorpci na částice zeminy. S tím souvisí omezená dostupnost a snaha rostlin i mikroorganismů tyto látky zpřístupnit a poté degradovat. Mikroorganismy přítomné v daném místě tak hrají důležitou roli při odbourávání xenobiotik v rhizosféře. Mikroorganismy degradují PCB anaerobní i aerobní cestou. Při anaerobní degradaci dochází k reduktivní dechlorinaci, a tím

degradaci výše chlorovaných kongenerů na níže chlorované, což vede jednak ke snížení toxicity a zároveň k lepšímu odbourávání aerobními bakteriemi. Mikroorganismy anaerobně degradující PCB působí spíše v konsorciích, pouze u několika málo bakteriálních druhů byla zjištěna schopnost anaerobně degradovat PCB v čistých kulturách. Aerobní cestou jsou PCB s nižším stupněm chlorace degradovány působením dioxygenas, jejichž činností dochází k otevření kruhu bifenylového jádra a může následovat mineralizace. Produkty této dráhy jsou chlorbenzoové kyseliny, které jsou odbourávány dolní degradační dráhou, a kyselina pentadienová, která je degradována vlastní degradační dráhou. Aktivita mikroorganismů podílejících se na degradaci PCB v zemině je ovlivňována přítomností rostlin. Rostliny uvolňují do prostředí organické sloučeniny, např. aminokyseliny, cukry a organické kyseliny, které mohou podporovat aerobní i anaerobní metabolismus chlorovaných sloučenin. Dále jsou kořenovým systémem do zeminy uvolňovány extracelulární enzymy, které iniciují přeměnu PCB a usnadňují tak jejich další bakteriální transformaci, různé mikrobiální růstové faktory a organické kyseliny a další molekuly, které působí jako surfaktanty a zvyšují tak dostupnost PCB v zemině. Sekundární metabolity rostlin patřící do skupiny terpenů a fenolických sloučenin mohou též indukovat expresi genů obsažených v bakteriální degradační dráze bifenyly, a tím podpořit bakteriální degradaci PCB. Rostliny rovněž zlepšují prokysličenou zeminu v oblastech kořenu, což je další stimulační faktor pro mikrobiální oxygenasy. Využití mikroorganismů a rostlin je dle dosavadních studií účinný způsob odstraňování PCB z životního prostředí. Jedním z cílů mikrobiální ekologie je izolace mikroorganismů z kontaminovaného prostředí, které disponují degradačními schopnostmi. Takto získané mikroorganismy lze dále použít pro bioremediační pokusy. Důležitou roli tak hraje optimalizace metod pro charakterizaci a identifikaci těchto mikrobů. Izolaci lze provádět dvěma způsoby, a to přímou extrakcí a po dlouhodobé kultivaci s bifenyly (selekční tlak substrátu) jako jediným zdrojem uhlíku a energie. V našich studiích jsme prokázali, že přímou extrakcí kultivovatelných bakterií do pyrofosfátu lze získat jiné druhy, než po dlouhodobém nahromaďování v přítomnosti bifenyly. Po izolaci mikroorganismů z rhizosféry dvou různých rostlinných druhů rostoucích ve stejné zemině kontaminované PCB (tabák – *Nicotiana tabacum*, lilek – *Solanum nigrum*) bylo zjištěno, že pouze jeden bifenyly metabolizující bakteriální druh (*Pseudomonas mendocina*) byl detekován v rhizosféře obou těchto rostlin. Z rhizosféry lilku byl dále izolován bakteriální druh *Ochrobactrum cytisi* a z rhizosféry tabáku *Achromobacter* sp. Další charakterizaci izolátů lze provést několika způsoby. Prvním

způsobem je biochemická charakterizace, při níž je srovnávána schopnost bakteriálních druhů metabolizovat různé substráty, včetně příslušného xenobiotika. Dalším způsobem charakterizace je využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (v angl. matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight). Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) je metoda, kterou lze použít k detekci, klasifikaci a identifikaci mikroorganismů na základě srovnání složení ribosomálních proteinů. Metoda biochemické charakterizace a stanovení složení ribosomálních proteinů jsou však metody určené k charakterizaci bakterií, které lze kultivovat v laboratorních podmínkách. Dosud však jako nej přesnější metoda identifikace je považována identifikace na základě určení sekvence 16S rRNA. Tato sekvence obsahuje konzervativní úseky, dle kterých lze navrhnout primery pro jejich amplifikaci a variabilní úseky, na jejichž základě lze jednotlivé bakterie identifikovat a porovnat mikrobiální diversitu, neboli zastoupení různých bakterií v prostředí. V posledních několika letech dochází také k rozvoji metod určených k charakterizaci a identifikaci bakterií, pro jejichž kultivaci v laboratoři dosud nebyly nalezeny podmínky. Jedná se o metody založené na analýze sekvence DNA a do této skupiny patří např. metoda SIP, neboli značení stabilními izotopy, T-RFLP, neboli restriční polymorfismus délky terminálních fragmentů, TTGE, elektroforesa v režimu s měnící se teplotou a DGGE, tedy gelová elektroforesa v denaturačním gradientovém gelu.

Poděkování: Tato práce byla vytvořena za přispění grantu MSM 6046137305, účelové podpory na specifický výzkum MŠMT č. 21/2010 a projektu GAČR 525/09/1058.

Kurzawová V., Uhlík O., Macek T., Macková M.: Interactions of microbes and plants and their importance in phyto/rhizoremediation in PCB contaminated soil

Bioremediation, the usage of biological systems for removing pollutants from the environment, is an effective tool of microbial ecology. Plants and microorganisms are part of the nature and the use of these systems for remediation does not lead to a negative intervention to the environment. Methods for characterization and identification of cultured microorganisms (mass spectrometry MALDI-TOF) and non-cultured microorganisms (SIP, T-RFLP, etc.) able to degrade PCBs has been developed recently. Microorganisms isolated from the contaminated soil can be used for other bioremediation purposes. Plants play an important role in the removal of xenobiotics from the environment as well. They are able to absorb pollutants from the contaminated soil, transform them to non-phytotoxic forms and store them in their tissues. Plants also positively affect the rhizosphere microbes by releasing compounds supporting bacterial growth and activity. Plants release secondary metabolites that are potential inducers of the expression of genes involved in the bacterial degradation pathway of PCBs. Higher concentration of these compounds in the rhizosphere could lead to better degradation of these compounds.

Key words: bioremediation, phytoremediation, rhizoremediation, PCBs, rhizosphere.

Kontaktní adresa – Contact address:

prof. Dr. Ing. Martina Macková, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6, Česká republika, e-mail: martina.mackova@vscht.cz