

# Spolupráce rostlin a mikroorganismů na degradaci chlorbenzoových kyselin

COOPERATION OF PLANTS AND MICROORGANISMS ON METABOLISATION OF CHLOROBENZOIC ACIDS

Blanka Vrchotová<sup>1,2</sup>, Milena Dražková<sup>1</sup>, Martina Macková<sup>1,2</sup>, Kateřina Demnerová<sup>1</sup>, Tomáš Macek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; <sup>2</sup>Ústav organické chemie a biochemie AV ČR  
Společná laboratoř ÚOCHB a VŠCHT Praha

Jednou z možností odstranění kontaminantů z životního prostředí je bioremediace – využití biologických systémů, rostlin a mikroorganismů. Pro širší využití je třeba nejdříve porozumět procesu bioremediace ve zjednodušených podmínkách. Cílem této práce bylo určit schopnost rostlin a mikroorganismů podílet se na metabolizaci chlorbenzoových kyselin, které se vyskytují jako produkty degradace xenobiotik, zejména polychlorovaných bifenyly (PCB), a jejichž koncentrace může negativně ovlivnit daný ekosystém. Schopnost rostlin metabolizovat chlorbenzoové kyseliny již byla prokázána na modelu rostlinných tkáňových kultur pěstovaných *in vitro*. Jednalo se o tkáňové kultury křenu selského, lilku černého a tabáku viržinského. Z uvedených druhů prokázaly nejlepší schopnost metabolizace chlorbenzoových kyselin buňky lilku černého. Tyto buňky byly schopné metabolizace 2-; 3-; 4-; 2,3-di; 2,4-di; 2,5-di a 2,3,5-tri chlorbenzoové kyseliny. K měření mikrobiální degradace byly použity 4 bakteriální kmeny izolované z půdy kontaminované PCB, které byly identifikovány jako *Pseudomonas* sp. Jednotlivé kmeny byly kultivovány s 200 mg.l<sup>-1</sup> 2,5-dichlorbenzoové kyseliny v minimálním médiu. Takto narostlé mikrobiální buňky byly promyty a naředěny minimálním médiem na OD<sub>600</sub> = 0,2. K připraveným buňkám byla následně přidána sledovaná chlorbenzoová kyselina do výsledné koncentrace 200 mg.l<sup>-1</sup>. Úbytek chlorbenzoové kyseliny byl stanoven jako rozdíl koncentrace v médiu na začátku pokusu a po 5 dnech kultivace. Koncentrace chlorbenzoové kyseliny byla stanovena na HPLC (HP 1100). Pro stanovení byla použita kolona Luna C18(2) 150 mm × 2,00 mm × 5 μm (Phenomenex, USA) a izokratická eluce s mobilní fází metanol: voda 1% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 60:40 pro 2,3,5-tri a 2,4,6-trichlorbenzoovou kyselinu a 55:45 pro ostatní chlorbenzoové kyseliny. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml.min<sup>-1</sup>, objem nástríku 10 μl, detekce pomocí DAD detektoru při vlnové délce 205 nm. Vybrané mikrobiální kmeny byly schopné degradovat 2-; 2,3-di a 2,5-dichlorbenzoovou kyselinu, kmeny A8 a A18 ještě také 3-chlorbenzoovou kyselinu s téměř 100% účinností. Degradční schopnosti kmene A7 a A19 si byly podobné stejně jako degradční schopnosti kmenů A8 a A18. Na základě těchto výsledků byly k testování spolupráce rostlin a mikroorganismů na degradaci chlorbenzoových kyselin vybrány vedle rostliny – lilku černého, bakteriální kmeny A7 a A8 dříve identifikované jako *Pseudomonas fluorescens*.

## Spolupráce rostlin a mikroorganismů na degradaci chlorbenzoových kyselin

Testování spolupráce rostlin a mikroorganismů na metabolizaci chlorbenzoových kyselin probíhalo tak, že k měsíc starým sterilním, hydroponicky pěstovaným rostlinám lilku černého byla

přidána chlorbenzoová kyselina (100 mg.l<sup>-1</sup>) a bakterie. Během čtrnáctidenní kultivace byla průběžně stanovována koncentrace chlorbenzoové kyseliny v mediu pomocí HPLC. Na konci pokusu byl stanoven celkový počet mikroorganismů a koncentrace chlorbenzoové kyseliny v mediu a v rostlinné biomase. Vedle případů kultivace rostlin a mikroorganismů dohromady byly za stejných podmínek jako kontrola kultivovány samotné rostliny a mikroorganismy bez přítomnosti rostlin. Při kultivaci rostlin lilku černého a bakteriálních kmenů A7 a A8 byly ze 100 % odstraněny 2-; 3- a 2,5-dichlorbenzoová kyselina. V případech přítomnosti rostlin i bakterií probíhal proces rychleji. Naopak u 4-; 3,4-di; 3,5-di; 2,3,5-tri a 2,4,6-trichlorbenzoové kyseliny byla zaznamenána metabolizace maximálně 20 % ve všech měřených případech. Ze stanovení koncentrace chlorbenzoové kyseliny v rostlinné biomase a z celkového počtu mikroorganismů na konci pokusu lze usuzovat na pozitivní vliv přítomnosti rostlin na přežívání mikroorganismů a zároveň snížení stresu pro rostliny v případech, kdy došlo k úbytku chlorbenzoové kyseliny v mediu.

*Poděkování: Tato práce vznikla za podpory grantů Centrum IM06011, MSM 6046137305, účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy č. 21/2010 a projektu NPV11 2B06156.*

## Vrchotová B., Dražková M., Macková M., Demnerová K., Macek T.: Cooperation of plants and microorganisms on metabolisation of chlorbenzoic acids

Cooperation of plants and microorganisms on chlorbenzoic acids metabolization was tested. Previously ability of plants and microorganisms metabolize chlorbenzoic acids were proved. Cocultivation experiments prove that in the case of 2-; 3- and 2,5-dichlorbenzoic acid the presence of both organisms in medium is beneficial and degradation is more efficient than was shown with individual organisms.

**Key words:** chlorbenzoic acid, plants, microorganisms, bioremediation, cooperation.

## Kontaktní adresa – Contact address:

prof. Ing. Tomáš Macek, CSc., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6 Dejvice, Česká republika, e-mail: tom.macek@uoachb.cas.cz

Ing. Blanka Vrchotová, Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, 166 28 Praha 6 Dejvice, Česká republika, e-mail: vrchotob@vscht.cz