

Bakteriální degradace perzistentních látek

Jedním z aktuálních problémů dnešní společnosti je čím dál větší znečišťování životního prostředí člověkem. K důležitým a mnohdy opomíjeným případům znečištění patří kontaminace půdy, např. velmi problematickými perzistentními látkami. Perzistence znamená, že tyto látky v určité míře odolávají přirozeným rozkladným procesům. Ukázkovým příkladem mohou být různé druhy plastů, které nejsou biologicky rozložitelné (biodegradabilní), jako např. lidskému zdraví ještě poměrně neškodné PET láhve. Ve své práci v rámci Středoškolské odborné činnosti jsem se zaměřil na sledování výskytu a schopnosti bakterií degradovat významnou skupinu znečišťujících a pro člověka toxických látek – polycyklické aromatické uhlovodíky. Jako modelovou látku jsme zvolili pyren – benzo(*d,e,f*)fenantren, který není rozkládán běžnými mikroorganismy.

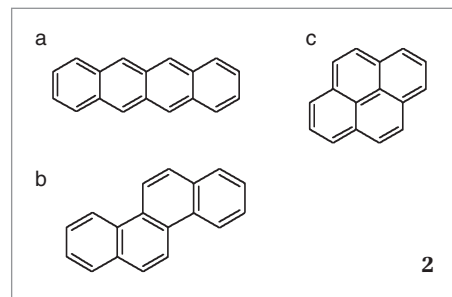
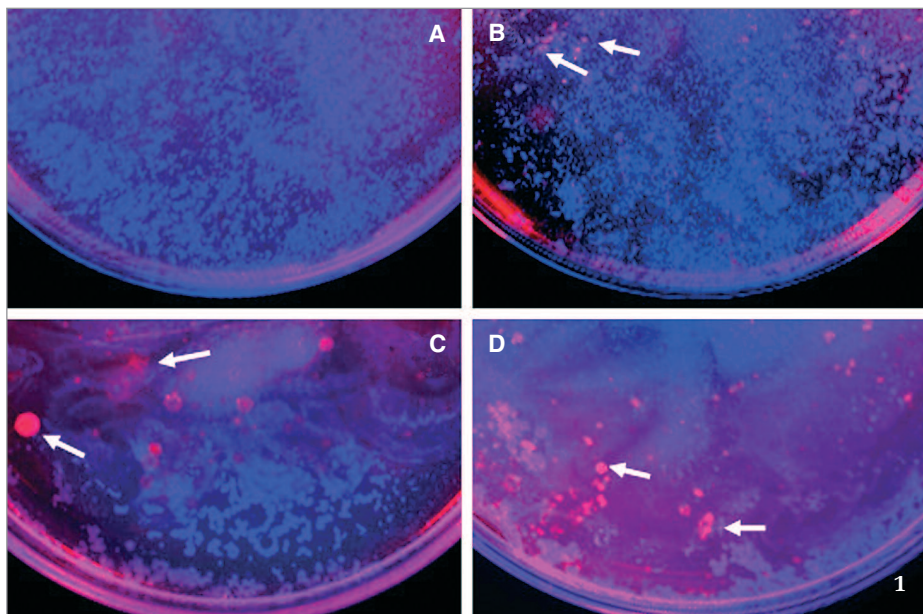
Polycyklické aromatické uhlovodíky (dále jen PAU, v angličtině PAH – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) jsou sloučeniny, které obsahují dvě a více kondenzovaných benzenových jader. Stejně jako v úvodu zmíněné polymerní plasty vykazují také některé PAU velmi vysokou odolnost k přirozeným fyzikálním a chemickým rozkladným procesům. Jejich škodlivosti přidává i to, že mnohé z nich mají karcinogenní účinky (spojované s narušením funkce DNA). Míru perzistence lze odvodit z jejich chemické struktury. Obecně platí, že degradabilita neboli rozložitelnost PAU klesá s narůstajícím počtem aromatických jader (tedy stoupající molekulovou hmotností) a je zároveň ovlivněna i jejich strukturou. Při lineárním uspořádání jader (např. tetracen, obr. 2a) jsou tyto látky nejméně stabilní; stabilita roste směrem ke klastrovému uspořádání (např. u pyrenu, obr. 2c) a nejvyšší je při angulárním uspořá-

dání (např. u chrysenu, obr. 2b). Otázkou je, jak se těchto látek v prostředí zbavit.

Odstraňování PAU z půdy do značné míry závisí na jejich vlastnostech, neboť uhlovodíky se adsorbují na půdní částice, např. zrnka písku. Existuje více možností, jak probíhá odstraňování těchto sloučenin z půdy: tékáním u nízkomolekulárních PAU, fotooxidací, vymýváním nebo příjmem vegetací. Z biotických faktorů rozklad provádějí nejčastěji bakterie, houby a řasy. Ve své práci jsem se soustředil na hledání zdrojů bakterií s touto schopností. Výhoda bakterií oproti eukaryotickým mikroorganismům spočívá především ve schopnosti rozkládat širší spektrum látek a v podstatně vyšší rychlosti degradace. Schopnost rozkládat PAU byla doposud nalezena u mnoha druhů bakterií, mezi nejúčinnější patří rody *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* nebo *Sphingomonas*.

Základním postupem byl odběr vzorků přímo z míst předpokládaného výskytu kontaminantu (půda znečištěná kamenouhelným dehtem, motorovým olejem nebo asfaltovou emulzí, olejový email apod.) a výsev na modelový substrát, kterým byl zvolen pyren. Tento uhlovodík se nachází přibližně uprostřed rozsahu molekulových hmotností PAU. Praktickou výhodou je i jeho minimální toxicita. Najde-li se bakterie, která dokáže rozkládat pyren, pak s vysokou pravděpodobností bude schopna rozkládat i jiné polycyklické aromatické uhlovodíky včetně nebezpečného benzo(*a*)pyrenu. Pevné vzorky lze poté homogenizovat ve sterilní misce a mikroorganismy uvolnit energickým promýváním do sterilní destilované vody. Malé objemy se nanesou na Petriho misky s agarovým gelem s minerálními látkami, ale bez organických živin, pokrytým tenkou vrstvou pyrenu. Na miskách přežije pouze takový mikroorganismus, který buď umí sám využít pyren jako potravu, anebo ten, jenž využívá metabolity vzniklé činností prvotního rozkladače. V druhém případě jde o tzv. konsorcium, u něhož je metabolismus dvou a více bakteriálních kmenů provázaný. Rozklad se při použití této metody projeví jako místní projasnění mléčné zakaleného povrchu misky. Průhledná místa se nazývají degradační (lytické) zóny a měly by obsahovat především bakteriální konsorcia nebo jednotlivé druhy rozkládající pyren. Pokud přeneseme mikroorganismy z těchto zón na novou Petriho misku s pyrenem jako jediným zdrojem uhlíku a energie, zbavíme se běžných bakterií a dalších mikroorganismů, jež nemají schopnost degradovat pyren nebo nejsou průvodními složkami konsorcia.

Degradační aktivitu bakterií můžeme nezávisle ověřit dvěma metodami. První z nich je fluorescenční fotografie, která využívá přirozenou fluorescenci pyrenu. Při vyfotografování misky pod ultrafialovým zářením přes vhodný filtr budou světla pouze ta místa, kde se nachází nerozložený pyren. Na druhou stranu degradační zóny vykazují buď slabou, nebo žádnou fluorescenci. Při překrytí fotografií pořízených s UV osvětlením a běžných snímků ve viditelné oblasti vznikne obrázek,

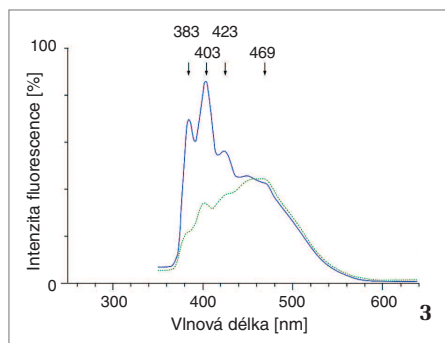


1 Digitálně složené fluorescenční fotografie rozmístění pyrenu (modře) a bakteriálního povlaku (červeně). Šipky směřují k jasně rozeznatelným bakteriálním koloniím. Snímky B, C a D zobrazují misky, kde proběhla zřetelná degradace. Miska A představuje kontrolní vzorek. Foto S. M. Tehrany
2 Chemická struktura vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků: tetracen (a), chrysen (b), pyren (c).

na němž se po grafické úpravě objeví roz-
místění degradačních zón a rovněž pří-
padných bakteriálních kolonií (obr. 1).

Ještě citlivější metodou je průkaz mizení
pyrenu z lytických zón Petriho misek po-
mocí fluorescenční spektroskopie. I u této
metody se využívá fluorescence pyrenu.
Vyříznuté bločky agaru včetně povrchové
vrstvy se zhomogenizují a přenesou do
křemenných kyvet, které umožňují měřit
fluorescenční spektra pyrenu a případně
i jeho produktů pomocí fluorometru. Pyren
má ve svém emisním spektru tři charakte-
ristická maxima, takže lze prokázat, zda
jeho fluorescence po působení aktivních
bakterií mizí (obr. 3), což odpovídá roz-
kladu a odstranění pyrenu v miskovém
modelu (obr. 1).

Pomocí těchto metod jsme našli 6 bak-
teriálních populací (viz dále) s překvapi-
vě vysokou schopností rozkládat pyren.
Přítomnost hub nebyla mikroskopicky
prokázána. Tak snadnou detekci hledané
skupiny bakterií lze připsat značnému
znečištění vybraných vzorků polycyklic-
kými uhlovodíky, pocházejícími zejména
z použitých motorových olejů a kamen-
uhelného dehtu. Na druhou stranu ale
v řadě vzorků nebyla očekávaná přítomnost
rozkladačů PAU patrná – např. u zvětra-
lého olejového nátěru nebo živичné směsi
pro silniční povrchy. Schopnost přežívání



bakterií rozkládajících uhlovodíky je znač-
ná. Potvrdili jsme degradační aktivitu
u referenčního vzorku skladovaného 10 let
za stálých podmínek (v chladu, tmě a v rov-
nováze se vzdušnou vlhkostí).

Nepodařilo se však určit, zda šlo u nale-
zených bakteriálních populací o konsor-
cium, nebo o samostatný bakteriální kmen.
Rovněž mechanismus rozkladu pyrenu
může být v jednotlivých případech odlišný.
Z fluorescenčních fotografií je patrné, že
degradační zóna je mnohdy daleko větší
než bakteriální kolonie. Tento jev můžeme
přičíst schopnosti bakterií rozpouštět a de-
gradovat pyren „na dálku“ pomocí pov-
rchově aktivních látek tvořených bakterie-
mi (šířka lytické zóny přitom odráží poměr
mezi produkcí těchto látek a rychlostí růstu

3 Fluorescenční spektrum – modrá
linka představuje emisní spektrum
nedegradovaného vzorku agarové půdy.
Na křivce jsou zřetelné tři vrcholy
charakteristické pro pyren
(při vlnových délkách 383 nm,
403 nm a 423 nm). Zelená přerušovaná
linka zobrazuje emisní spektrum
po degradaci pyrenu působením
bakterií. Z průběhu křivky je zřejmý
úbytek fluorescence v oblastech
charakteristických pro pyren.
Orig. všech obr. S. M. Tehrany

kolonie). To může být výhodou v případě,
že jde o konsorcium, kde se na degradaci
podílí více než jeden bakteriální druh.

Čisté kmeny, získané pasážováním na
běžných bakteriologických půdách, se
stálou degradační aktivitou by měly být
taxonomicky určeny a dále charakterizo-
vány. Taxonomické zařazení je velmi dů-
ležité, protože v každém z případů může
jít o patogenní druh bakterie. Dalším stan-
dardním postupem je stanovení účinnos-
ti degradace za řízených podmínek a pří-
padně i schopnosti degradovat další PAU.
Pokud by se ukázalo, že kmen vyhovuje
průmyslovému využití, potom lze vyví-
nout metodu k odstraňování PAU a tím
příspěk k obnově zasažených území a zlep-
šení životního prostředí.

Jiří Libus

Za vším hledej auxin

Jakmile začal život vytvářet mnohobuněčné formy, vyvstala potřeba komuni-
kace mezi jednotlivými buňkami. Vlastně ta potřeba existovala už dříve. O řadě
bakterií je známo, že dokážou reagovat na hustotu své populace. Tu vnímají
jako koncentraci signálních látek vylučovaných každou jednotlivou buňkou
(tzv. quorum sensing, viz také Živa 2012, 3: 104–106). Jiné molekuly jsou vypouš-
těny bakteriemi jako signál ve stresu. Čím složitější organismus, tím přesněji
musí koordinovat funkci každé buňky. Vznikla proto soustava hormonů. Hor-
mony zásadním způsobem ovlivňují také růst a vývoj rostlin a jsou právem
jedním z nosných témat rostlinné biologie. I v Ústavu experimentální botaniky
AV ČR, v. v. i., jim věnujeme značnou pozornost – ve dvou laboratořích, které
patří v rámci ústavu mezi největší a publikačně nejúspěšnější. Proto jsme
vybrali jako téma článku vztahujícího se k 50. výročí založení ústavu (viz Živa
2013, 2: XXXV–XXXVI a str. LII kulěrové přílohy tohoto čísla) hormon auxin.

Termínem hormony se obvykle rozumějí
chemické látky produkované buňkami,
které jsou v nízkých koncentracích vní-
mány (jinými) buňkami, což vede k fyzi-
ologické odpovědi. Hormonální regulace
je důležitá zřejmě pro všechny mnohobu-
něčné organismy. U řady živočichů nemo-
hou chemické signály putující na velkou
vzdálenost splnit nároky kladené na rych-
lost některých reakcí potřebných k přežití.
Takové situace vyžadují zapojení nervové
soustavy, uváděné jako výsada živočichů

a dodávající jim punc nadřazenosti. Vše-
obecně se méně ví, že rostliny rovněž po-
užívají elektrickou komunikaci na velké
vzdálenosti. Mají vlastní soustavu ionto-
vých kanálů a dalších struktur potřebných
např. pro vznik a šíření akčního potenciálu
podél lýkové části cévních svazků. Způ-
sob života rostlin je však velmi odlišný
a i rychle rostoucí druhy většinou vystačí
ve své odpovědi na životní podmínky
s reakční dobou v řádu minut až hodin.
Typické cévnaté rostliny jsou připoutány

k určitému stanovišti, které nemohou opu-
stit. Spoléhají proto na schopnost upravit
stavbu i funkce svého těla podle místních
podmínek. Rostlinné hormony (fytohor-
mony) z velké části určují architekturu
rostlin – prodlužování a větvení stonku
i kořenů (Živa 2001, 6: 249–251), případ-
ně přechod do plodné fáze života, nebo
„detaily“ jako umístění trichomů a průdu-
chů. Ovládají ale také otevírání průduchů,
ohyby stonku i kořene nebo nastavení
optimální polohy a natočení listů a květů.

Dokáže auxin mnoho různých věcí, nebo pořád jen tu jednu?

Prvním hormonem, který se podařilo u rost-
lin objevit, byl auxin (viz Živa 2001, 3:
105–106). A od té doby se ukazují stále
další procesy, které auxin ovlivňuje (Živa
2007, 1: 8–12). V učebnicích fyziologie
nalezneme seznam dějů, na jejichž prů-
běhu se konkrétní hormon podílí. V přípa-
dě auxinu by bylo úspornější vyjmenovat,
které životní projevy nepostihuje – pokud
by se takové vůbec našly. Pro představu
zde vybírám několik příkladů, k čemu vede
poškození genů souvisejících s auxinem:
nefunkční polární transport auxinu zabrá-
ní vytvoření hlavní osy souměrnosti zá-
rodku (mutace *gnom*); vývoj embrya bez
funkčního receptoru pro auxin se zastaví
ještě před založením děloh (*abp1*); zárod-
ky s poškozeným genem pro transkripční
faktor Auxin Response Factor 5 (*ARF5*;
monopteros) vůbec nevytvorí základ koře-
ne; vyřazení přenašeče auxinu PIN1 způ-
sobí, že lodyha normálně nesoucí kvě-
tenství nezaloží žádné orgány – je holá
(*pin-formed*); kořeny mutantů v genech pro
další přenašeče auxinu postrádají schop-
nost udržet růst směrem dolů (*pin2*, *aux1*);
nadměrná tvorba auxinu u mutantu *yucca*