

# THE EFFECT OF NATURAL COMPOUNDS ON COMPOSITION OF BACTERIAL CONSORTIA IN SOIL CONTAMINATED WITH POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBS)

## VLIV PŘÍRODNÍCH LÁTEK NA SLOŽENÍ BAKTERIÁLNÍCH SPOLEČENSTEV V ZEMINĚ KONTAMINOVANÉ POLYCHLOROVANÝMI BIFENYLY (PCB)

**Lucie Musilová 1), Ondřej Uhlík 1,2), Martina Macková 1,2), Tomáš Macek 1,2)**

1) *Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha, e-mail: lucie.musilova@vscht.cz*

2) *Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Společná laboratoř ÚOCHB a VŠCHT Praha, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha*

### Abstract:

This study deals with the effect of natural compounds on composition of bacterial consortia and presence of enzymes used for degradation of PCB. Result can be potentially used for bioremediation strategies.

### Keywords:

natural compounds, bioremediation, bacterial consortia, PCB

### Úvod

Polychlorované bifenyly představují skupinu chemických sloučenin, které se do životního prostředí dostaly téměř výhradně vlivem člověka. Vznikají chlorací bifenyly, která je katalyzována železitými ionty nebo železem [1]. Tato reakce není příliš specifická, což je příčinou vzniku směsi až 209 kongenerů, které se od sebe liší stupněm chlorace a rozmištěním atomů chloru na bifenylové kostře. Komerční směsi navíc obsahují polychlorované dibenzofurany, což jsou také toxické látky vznikající jako vedlejší produkty reakce. PCB jsou odolné vůči účinkům kyselin a zásad, jsou hydrofobní (s rostoucím stupněm chlorace roste i hydrofobicita), nepodléhají oxidaci ani redukci běžně používanými činidly, mají nízkou tenzi par a velký elektrický odpor. Všechny tyto vlastnosti byly výhodné pro technologické využití např. v transformátorových olejích, kondenzátorech, nehořlavých složkách nátěrových barev nebo pro použití v hydraulických kapalinách [2]. K dostání bylo velké množství směsí, které se vzájemně lišily obsahem PCB s různým stupněm chlorace, mezi nejznámější směsi PCB patří Delor, Aroclor nebo Fenclor. Výroba probíhala od 30. let 20. století a postupem času se začaly objevovat případy poukazující na toxicitu (změna kůže, zvětšení jater, sleziny a/nebo štítné žlázy a pravděpodobně vznik nádorů) těchto látek a na jejich akumulaci v životním prostředí. Proto došlo k zastavení výroby PCB v průběhu 70. let 20. století, v bývalém Československu byla výroba zastavena až v roce 1984, přičemž výrobce Chemko Strážské vyrobil od roku 1951 do svého uzavření 21 500 t PCB [3]. PCB jsou zařazeny mezi perzistentní organické polutanty, které představují větší množství látek, jejichž společné vlastnosti jsou toxicita, schopnost přetrvávat v životním prostředí beze změny, atmosférický transport na dlouhé vzdálenosti a akumulace v organismech. V roce 2001 byla sepsána Stockholmská úmluva, ve které se státy, které ji ratifikovaly, zavazují ke snížení obsahu perzistentních organických polutantů v životním prostředí. V ČR vstoupila úmluva v platnost v roce 2004.

Kvůli vlastnostem vedoucím k celosvětovému využívání PCB je jejich odstraňování fyzikálně-chemickými metodami náročné a při spalování je nutné udržovat stálou vysokou teplotu, jinak vznikají dioxiny, které jsou ještě toxičtější než PCB [2]. Jako ekologičtější a finančně šetrnější metoda se jeví využití bioremediačních strategií zahrnujících působení půdních mikroorganismů, lipolytických hub a některých rostlin [4,5]. PCB byly považovány za rezistentní k mikrobiální degradaci, ale byly popsány mikroorganismy schopné degradace určitých kongenerů. Monochlorované bifenyly mohou být využívány jako zdroj uhlíku, ostatní kongenery bývají aerobně transformovány pomocí kometabolismu, který nepřináší zisk energie a vyžaduje indukci [2]. Existují i anaerobní bakterie, které jsou schopné dehalogenace vícechlorovaných PCB, čímž je zpřístupňují aerobním bakteriím [2]. Nicméně se u PCB objevuje problém, že dochází k jejich sorpci na půdní matici a jejich nízká rozpustnost ve vodě ztěžuje transport do buněk [6].

## Degradace PCB

Aerobní degradace PCB u bakterií je umožněna enzymy, které jsou kódovány v bifenylovém (*bph*) operonu [2], a má dvě dráhy – horní bifenylová dráha je sled reakcí, které přeměňují bifenyl na benzoovou kyselinu a pětiuhlíkatou alifatickou kyselinu, jež je poté enzymy dolní bifenylové dráhy přeměňována na pyruvát a acetylkoenzym A [7].

U modelových bakterií *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 a *Burkholderia xenovorans* LB400 obsahujících *bph* operon dochází k indukci transkripce v přítomnosti bifenyly v prostředí [8,9]. Nicméně plošná aplikace bifenyly do životního prostředí není možná, kvůli jeho toxicitě pro vodní organismy a možné toxicitě pro suchozemské organismy při dosažení vyšší koncentrace, než je v prostředí dosud [10].

### Vliv sekundárních metabolitů rostlin

Rostliny produkují více než 100 000 různých nízkomolekulárních sekundárních metabolitů (sloučeniny, které nejsou nezbytné pro přežití rostliny) a mezi nejrozšířenější skupiny patří terpeny a fenolické látky [11]. Některé z těchto metabolitů jsou vylučovány rostlinnými kořeny do oblasti rhizosféry, kde umožňují větší nárůst mikrobiálních populací ve srovnání se zemí bez kořenů rostlin, protože jsou často využívány jako zdroj uhlíku a energie, a díky strukturní podobnosti některých z nich s polutanty mohou stimulovat degradační aktivity bakterií [12]. Také bylo provedeno několik studií, ve kterých se autoři věnovali vlivu sekundárních metabolitů rostlin na odbourávání organických xenobiotik ze vzorků zeminy [13,14,15,16]. Kořeny rostlin podléhají sezónní obměně a při odumření poskytují další živiny a po jejich rozkladu vznikají místa, kudy může pronikat do zeminy vzduch, který může zefektivnit aerobní odbourávání polutantů [17].

Stimulace bakteriálních populací přirozeně přítomných v kontaminovaném prostředí k růstu a degradaci je pravděpodobně mnohem efektivnější než přidávání bakterií schopných degradace do prostředí, protože tam nemusí být schopné přežít kvůli mezidruhovému soupeření, možné přítomnosti inhibujících látek, nedostatečnému nárůstu, biologické nedostupnosti kontaminantu pro daný druh, nebo přednostnímu využívání jiného substrátu než kontaminantu [18].

## Experimentální část

Naše experimentální práce se zabývala studiem vlivu sekundárních metabolitů naringinu, kyseliny kávové a limonenu na složení bakteriálních společenstev v zemině dlouhodobě kontaminované PCB.

Sekundární metabolity byly suspendovány v minerálním médiu neobsahujícím jiný zdroj uhlíku a poté byly v paralelách přidávány ke vzorkům zemin po dobu 8 týdnů. Po uplynutí této doby byly paralely spojeny a homogenizovány. Následovalo odebrání vzorků pro izolaci metagenomické DNA, analýzu profilů bakteriálních společenstev a potvrzení přítomnosti genů pro velkou podjednotku bifenyldioxygenasy (EC 1.14.12.18).

Bifenyldioxygenasa je prvním enzymem horní bifenylové dráhy (na obr. 1 je označena jako BphA). Přítomnost genu kódujícího velkou podjednotku tohoto enzymu byla potvrzena pomocí metody Nested PCR ve všech vzorcích. Tato skutečnost odpovídá předpokladu, že v kontaminované zemině jsou přítomny organismy schopné využívat bifenyl/PCB.

Pro sestavení profilů bakteriálních společenstev byla využita metoda T-RFLP, která patří mezi restriční analýzy. Metagenomická DNA byla izolována ze zeminy a amplifikována metodou PCR s využitím značeného primeru. Získané úseky DNA byly štěpeny restriční endonukleasou a rozděleny pomocí elektroforézy s detekcí značených koncových fragmentů. Pro možnost přiřazení identity k některým signálům ze získaných profilů bylo použito klonování a sekvenace genu pro 16S rRNA.

## Závěr

Získané výsledky potvrzují, že se v kontaminovaném prostředí nacházejí mikroorganismy, které mají potenciál k využití kontaminantu ve svůj prospěch a že přírodní látky umožňují selektivní nabohacení mikroorganismů, které tento potenciál mohou mít [19].

Další studium by mohlo vést k identifikaci přírodních látek umožňujících zefektivnění bioremediačních technik – mohou být přidávány v čisté formě, což je nákladnější, nebo jako produkty rostlin vysazených na kontaminovaných místech. Ještě vyšší efektivitu je možné očekávat, pokud se podaří najít rostliny schopné produkce požadovaného sekundárního metabolitu, které jsou samy zároveň schopny transformace polutantu.

## Poděkování

Práce byla sponzorována granty MŠMT NPV II 2B06156 a 2B08031.

## Použitá literatura

- [1] SAFE S. (1993): Toxicology, Structure-Function Relationship, and Human and Environmental Health Impacts of Polychlorinated Biphenyls: Progress and Problems 100, 258-268
- [2] TOTEVOVÁ S., PROUZA M., BRENNER V., DEMNEROVÁ K. (1997): Bakteriální degradace PCB, Chem. Listy 91, 858-866
- [3] <http://www.c-t-i.cz/ep-pcb1.asp> (18. 8. 2010)
- [4] MACEK T., MACKOVÁ M., KAŠ J. (2000): Exploitation of Plants for the Removal of Organics in Environmental Remediation, Biotechnol. Adv. 18, 23-34
- [5] MACKOVÁ M., DOWLING D., MACEK T. (2006): Phytoremediation and rhizoremediation. Theoretical background. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 300 pp.
- [6] KUIPER I., LAGENDIJK E. L., BLOEMBERG G. V., LUGTENBERG B. J. (2004): Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction, Mol. Plant Microbe Interact. 17, 6-17
- [7] FURUKAWA K. (2000): Biochemical and genetic base of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs); J. Gen. Appl. Microbiol. 46, 283-296
- [8] WATANABE T., FUJIHARA H., FURUKAWA K. (2003): Characterization of the second LysR-type regulator in the biphenyl-catabolic gene cluster of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707; J. Bacteriol. 12, 3575-3582
- [9] BELTRAMETTI F., RENIERO D., BACKHAUS S., HOFER B. (2001): Analysis of transcription of the *bph* locus of *Burkholderia* sp. strain LB400 and evidence that the *orf0* gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter; Microbiology 147, 2169-2182
- [10] <http://www.npi.gov.au/substances/biphenyl/environmental.html> (24. 8. 2010)
- [11] SINGER A. C., CROWLEY D. E., THOMPSON I. E. (2003): Secondary plant compounds in phytoremediation and biotransformation, Trends Biotechnol. 21, 123-130
- [12] SINGER A. C., THOMPSON I. P., BAILEY M. J. (2004): The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implication for phytoremediation, Curr. Opin. Microbiol. 7, 239-244
- [13] SINGER A. C., GILBERTS E. S., LUEPROMCHAI E., CROWLEY D. E. (2000): Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carbon and surfactant-grown bacteria, Appl. Microbiol., Biotechnol. 54, 838-843
- [14] LEIGH M. B., PROUZOVÁ P., MACKOVÁ M., MACEK T., NAGLE D. B., FLETCHER J. S. (2006): Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Degrading Bacteria Associated with Trees in a PCB-Contaminated Site, Appl. Environ. Microbiol. 72, 2331-2342
- [15] LUO W., D'ANGELO E. M., COYNE M. S. (2005): Plant secondary metabolites, biphenyl, and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin effects on aerobic polychlorinated biphenyl removal and microbial community structure in soils, Soil Biol. Biochem. 39, 735-743
- [16] REZEK J., IN DER WIESCHE C., MACKOVÁ M., ZADRAŽIL F., MACEK T. (2009): Biodegradation of PAHs in long-term contaminated soil cultivated with European white birch (*Betula pendula*) and red mulberry (*Morus rubra*) tree, Int. J. Phytoremediation 11, 66-81
- [17] LEIGH M. B., FLETCHER J. S., FU X., SCHMITZ F. J. (2002): Root turnover: An important source of microbial substrates in rhizoremediation of recalcitrant contaminants, Environ. Sci. Technol. 36, 1579-1583
- [18] GERHARDT K. E., HUANG X. D., GLICK B. R., GREENBERG B. H. (2009): Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and Challenges, Plant Sci. 176, 20-30
- [19] UHLÍK O., JEČNÁ K., MACKOVÁ M., VLČEK Č., HROUDOVÁ M., DEMNEROVÁ K., PAČES V., MACEK T. (2009): Biphenyl-Metabolizing Bacteria in the Rhizosphere of Horseradish and Bulk Soil Contaminated by Polychlorinated Biphenyls as Revealed by Stable Isotope Probing, Appl. Environ. Microbiol. 75, 6471-6477