SLEDOVÁNÍ TOXICKÝCH ÚČINKŮ CHEMICKÝCH LÁTEK POMOCÍ BAKTERIÁLNÍHO KMENE *RHIZOBIUM MELILOTI*

Monika Urbancová[1]
[1]*Ostravská Univerzita v Ostravě, Dvořákova 7, 701 03 Ostrava, 605051552, p11024@student.osu.cz*

Abstrakt

Cílem studie bylo kvantifikovat toxické účinky vybraných aktivních organických látek v pesticidech (fenantren a carbendazim) a těžkých kovů (kadmium a zinek) pomocí kolorimetrického testu toxicity na bakteriálním kmeni *Rhizobium meliloti*. Test využívá schopnosti bakterie redukovat barvivo MTT (3-(4,5dimethylthiazole-2-yl-)2,5-difenyltetrazoliumbromid) v dýchacím řetězci. Toxické látky se naváží místo MTT a inhibují redukci barviva. Hodnotícím kritériem v kolorimetrickém testu je snižování absorbance s rostoucím množstvím toxické látky. Hlavním výstupním ukazatelem je hodnota inhibice redukce barviva vyjádřená indexem IC 50. Test trvá 90 minut a výsledné hodnoty IC50 jsou porovnatelné s ostatními testy akutní toxicity.

Klíčová slova: *ekotoxikologie; síran kademnatý; pesticidy; akutní test toxicity; kolorimetrický test*

Úvod

V posledních desetiletích došlo, v důsledku prudkého rozvoje průmyslové a zemědělské výroby, ke kontaminaci životního prostředí xenobiotickými látkami [1, 2]. Mezi nejvýznamnější environmentální polutanty patří těžké kovy, pesticidy, hnojiva nebo kaly používané k rekultivaci půd [8, 2]. Snahu detekovat, eliminovat látky znečišťující životní prostředí a zjistit celkový rozsah ovlivnění ekosystému, zajišťuje obor ekotoxikologie [5, 9, 10, 11] Ekotoxikologie se zabývá působením toxických polutantů na živé organismy, jejich prostředí, biodiverzity společenstev a celkové citlivosti organismů na znečištění [5, 9, 10, 11]. K zjišťování vlivu toxických polutantů na organismy se používají toxikologické biotesty. Výsledkem testů jsou hodnoty endpoints, které udávají dávku toxické látky potřebné pro vyvolání toxického účinku [5, 9, 10, 11].

Akutní test toxicity na bakteriálním kmenu *Rhizobium meliloti* je založený na schopnosti bakterie redukovat barvivo MTT (3-(4,5dimethylthiazole-2-yl-)2,5-difenyltetrazoliumbromid) v dýchacím řetězci. Vizuálně lze zjistit redukci změnou barvy, kdy neredukovaná forma barviva má žlutou barvu a mění se na redukovanou formu tmavě modrou [10]. Přítomnost toxického polutantu, inhibuje redukci barviva [3, 4, 7]. Vyjádřením inhibice redukce barviva MTT je hodnota IC50, která určuje objem toxické látky inhibující 50% bakteriím redukci barviva MTT. Hodnotu IC50 lze přepočítat na hodnotu ppm ($mg.l^{-1}$) [3, 4, 7]. Test lze porovnat s dalšími testy akutní toxicity. Bodsford použil biotest k měření akutní toxicity těžkých kovů [3], organických látek [4] a pesticidů [7]. Cílem práce bylo ověřit aplikovatelnost testu na kationty těžkých kovů kadmium a zinek a účinných látek v pesticidech fenantren a carbendazim

Materiál a metodika

Mezi chemikálie potřebné k testu patří YMA živné medium, na kterém se bakterie uchovávají, L-medium potřebné pro kultivaci bakterií na test, roztok barviva MTT, toxická látka

v určité koncentraci (nečastěji 330ppm), destilovaná voda a fosfátový pufr. Potřebným materiálem je čisté laboratorní sklo a potřebným technickým zařízením pro test je spektrofotometr, centrifuga, analytické váhy, vodní lázeň, mikropipety, třepačka a minishaker.

Bakterie se uchovávají na plotnách s YMA živným médiem. Před sérií testů je doporučováno provedení zkoušky ověřující citlivost bakterií, a to odebráním části kolonie kličkou na filtrační papír a zakápnutím roztokem MTT. Když filtrační papír zmodrá, jsou bakterie citlivé pro test. Asi 16 hodin před testem se bakteriální kmen zaočkuje do 10ml L-media a nechá se přes noc kultivovat při 30°C za kontinuálního třepání při 150 ot./min. Ráno v den testu se kmen odstředí v centrifuze při 4000G po dobu 10 minut, slije se supernatant a naředí ve fosfátovém pufru na hodnotu E=0,3 při 550nm. Do 10-ti zkumavek se podle tabulky č.1 napipetují roztoky bakteriálního kmene, fosfátového pufru, toxické látky a destilovaná voda. Změří se počáteční absorbance, která se odečte od absorbancí v čase. Přidá se barvivo MTT a zkumavky se nechají inkubovat 30 minut ve vodní lázni při 30°C. Změří se absorbance a celý proces se opakuje. Po 90 minutách inkubace je test ukončen.

K statistickému vyhodnocení dat bylo použito lineární a logaritmické regrese v závislosti na koeficientu determinace $0{,}8 \leq R^2 \leq 1$ [3, 4, 7]. Pro výpočet hodnoty IC50(x) lineární regresí platí vzorec:

$x = \frac{\frac{Y}{2} - B}{m}$ Pro výpočet hodnoty IC50(x) logaritmickou regresí platí vzorec: $\log x = \frac{\frac{Y}{2} - B}{m}$

$IC50 = 10^x$ kde: m je sklon regresní přímky, B je průsečík regresní přímky, Y je rozdíl absorbance kontroly. Takto stanovená hodnota IC50 odpovídá jednotkám v µl, proto se provádí přepočet hodnot na ppm: $x \cdot 10^{-6} l \cdot a\, mg \cdot l^{-1} \cdot \frac{1}{z \cdot 10^{-3}} ml$ kdy x je hodnota IC50 v µl, a je ředění v $mg.l^{-1}$, z je hmotnost toxické látky v zásobním roztoku na 10 ml rozpouštědla.

Tabulka 1. (Koncentrační řady pro přípravu zkumavek)

Číslo zkumavky	Fosfátový pufr (ml)	destilovaná voda (ml)	Bakteriální kmen (ml)	Toxická látka (µl)	MTT (µl)
1.	1	1,200	1	0	100
2.	1	1,190	1	10	100
3.	1	1,175	1	25	100
4.	1	1,150	1	50	100
5.	1	1,125	1	75	100
6.	1	1,100	1	100	100
7.	1	1,000	1	200	100
8.	1	0,900	1	300	100
9.	1	0,800	1	400	100
10.	1	1,200	1	0	100
11.	0	3,200	0	0	0

Výsledky a diskuse

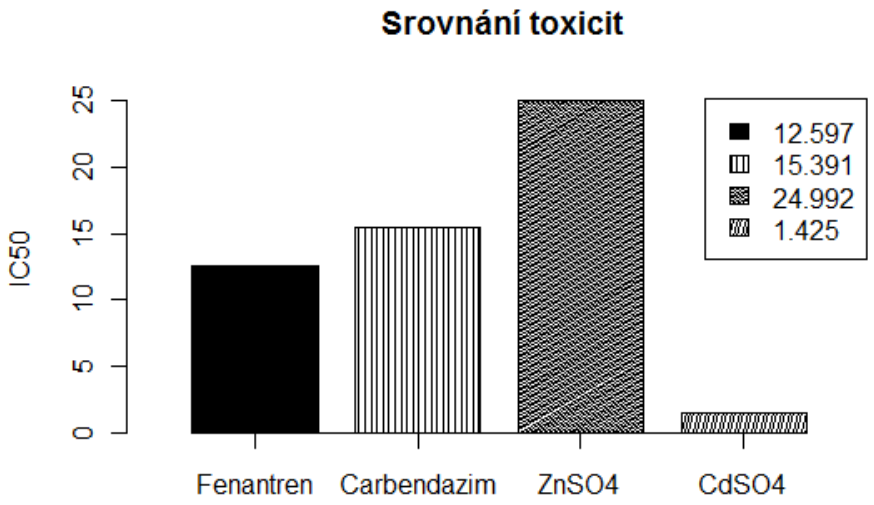
Testy byly provedeny ve dvou opakováních a pro každé opakování 2 paralelní stanovení. Byla stanovena akutní toxicita IC50 inhibice redukce barviva MTT. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. (Výsledné hodnoty IC50 a výpočet IC50)

Název látky	Koncentrace(ppm)	R^2	Rovnice regrese	IC50 (ppm)
$CdSO_4$	330	0,936	y = -0,183ln(x) + 0,2008	$1{,}425 +/- 0{,}0316 .10^{-3}$

		0,936	y = -0,288ln(x) + 0,3134	
		0,829	y = -0,203ln(x) + 0,301	
$ZnSO_4$	330	0,829	y = -0,203ln(x) + 0,302	24,992+/-0,0316 .10^{-3}
		0,841	y = -0,462ln(x) + 0,5573	
Fenantren	330	0,899	y = -0,458ln(x) + 0,6448	11,597+/-4,238.10^{-3}
		0,934	y = -0,0014x + 0,3828	
Carbendazim	5000	0,817	y = -0,0015x + 0,441	15,391+/-2,18.10^{-3}

Obrázek 1. (Graf srovnání toxicit testovaných látek).



Z grafu č. 1 a Tabulky č. 2 vyplývá, že největší toxicitu vykazuje síran kademnatý 1,4 ppm a nejmenší síran zinečnatý 25 ppm. Toxicita účinných látek obsažených v pesticidech – carbendazimu a fenantrenu dosahovala hodnoty IC50 12,6 a 15,4 ppm. Ferreira a kol. [6.] testovali kadmium a carbendazim pomocí testu akutní toxicity na *Daphnia magna*. Pro kadmium naměřili hodnoty 79.05 ppb a pro carbendazim 70 ppb. Oproti testu toxicity na *Rhizobium meliloti* je test na *Daphnia magna* citlivější. Yan a kol.[12] sledoval toxicitu fenantrenu na rostlině *Vallisneria spiralis* a stanovili hodnotu efektivní koncentrace EC50 4.69 ppm. Hodnoty toxicity byly srovnatelné s hodnotami toxicity na *Rhizobiu meliloti*.

Závěr

Test akutní toxicity na bakterii *Rhizobium meliloti* byl použit k stanovení toxicity kationtů těžkých kovů kadmia a zinku a k stanovení toxicity účinných látek v pesticidech fenantrenu a carbendazimu. Byl potvrzen toxický účinek těchto látek a stanovena hodnota IC50. Test je použitelný pro stanovení akutní toxicity vybraných látek a společně s použitím dalších testů toxicity dokresluje působení vybraných polutantů v prostředí.

Poděkování

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Haně Sezimové, Ph.D. za pomoc při přípravě příspěvku a mnoho trpělivosti. Dále bych chtěla poděkovat panu Mgr. Jiřímu Červeňovi za pomoc při

přípravě laboratorního náčiní a živných medií. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Pánu Ježíši Kristu, jež při mně celou dobu mého studia stál a stojí dál.

Literatura

[1.]ALI, H. *Biodegradation of synthetic dyes-a review*. Water Air & Soil Pollution, 2010, 213(1-4), p. 251-273. ISSN 0049-6979.

[2.]ANTUNES, S. C.; PEREIRA, J. L.; CACHADA, A.; DUARTE, A. C.; GONCALVES, F.; SOUSA, J. P. & PEREIRA, R. *Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: Suitability of elutriate testing.* Journal of Hazardous Materials, 2010, 184(1-3). p. 215-225. ISSN 0304-3894.

[3.]BOTSFORD, J. L. *A simple method for determining the toxicity of chemicals using a bacterial indicator organism.* Environmental Toxicology, 1999, 14(2), p. 285-289. ISSN 1520-4081.

[4.]BOTSFORD, J. L. *Role of EDTA in a simple method for determining toxicity using a bacterial indicator organism*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2000, 16(4), p. 353-359. ISSN 0959-3993.

[5.]FARGAŠOVÁ, A. *Environmetnálna toxikologia a všeobecná ekotoxikologia*. 1. vydanie, Bratislava: ORMAN, 2008. ISBN 789-80-969675-6-8.

[6.]FERREIRA, A. L.G.; AMADEU, S. L. & SOARES, M. V. M. *Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 2008, 89(1,11) p. 28-39. ISSN 0166-445X.

[7.]HILLAKER, T. L. & BOTSFORD, J. L. *Toxicity of herbicides determined with a microbial test*. Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology, 2004, 73(3), p. 599-606. ISSN 0007-4861.

[8.]MAMINDY-PAJANY, Y.; GERET, F.; ROMÉO, M.; HUREL, CH. & MARMIER, N. *Ex situ remediation of contaminated sediments using mineral additives: Assessment of pollutant bioavailability with the Microtox solid phase test*. Chemosphere, 2012, 86(11) p. 1112-1116, ISSN 0045-6535.

[9.]MING-HO-YU. *Environmental toxicology: Biological and health effects of pollutants.* 2. edition. United States of America: CRC Press, 2005. ISBN 1-556679-670-X.

[10.]PAVLÍKOVÁ, D.; PAVLÍK, M.; MATĚJŮ, L. & BALÍK, J. *Ekotoxikologie.* 2. vydání, Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, 2008. Studijní text. ISBN 978-80-213-1843-4.

[11.]PROKEŠ, J. A KOL. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie.* 1. vydání, Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-301-X.

[12.]YAN, Z. S.; HU, Y. & JIANG, H. L. *Toxicity of phenanthrene in freshwater sediments to the rooted submersed macrophyte, vallisneria spiralis.* Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology, 2011, 87(2) p. 129 – 133. ISSN 1432-0800.

Abstract

This article deals with applications toxicity colorimetric assay on bacterial phylum *Rhizobium meliloti* to evaluate a toxicity of chosen active organic compounds in pesticides carbendazim and phenanthrene occurred in the environment as persistent pollutants. A bacterial phylum ability of reduce the MTT dye in its respiratory chain is used in this assay. Toxic chemicals are bonded on the respiratory chain and preclude MTT dye to reduce. Absorbance values are decreased with increased amount of toxic chemicals. The inhibition reduction value IC50 is settled. Cadmium sulfate was used as standard. This assay takes 90 minutes and IC50 values are comparable with other acute toxicity assay endpoints.