

# BAKTERIÁLNÍ TESTY TOXICITY A JEJICH VYUŽITÍ PRO HODNOCENÍ EKOLOGICKÝCH ZÁTĚŽÍ

**Petra Mikušová**

*Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě, 30. dubna 22, 701 03 Ostrava, mikusova.pet@gmail.com*

## **Abstrakt**

Cílem práce bylo posoudit vhodnost dvou vybraných bakteriálních ekotoxikologických testů pro hodnocení toxicity produktů biodegradace plastů. Zvolenými testy ekotoxicity byly kolorimetrický test na bakteriích rodu *Rhizobium meliloti* a zkouška na luminiscenčních bakteriích *Vibrio fischeri*. V obou případech byla sledována míra inhibice metabolických pochodů bakterií v závislosti na toxickém působení testované látky, jež se v případě bakterií *R. meliloti* projevuje jako inhibice redukce přidaného barviva a v případě *V. fischeri* dochází k úbytku světelné emise v závislosti na koncentraci toxické látky. Provedenými testy byla zjištěna akutní toxicita látek ve vzorcích produktů po biodegradaci plastů pomocí mikroorganismů.

***Klíčová slova:*** ekologické zátěže; plasty; biodegradace; kolorimetrický test; luminiscenční test

## **Úvod**

V souvislosti s rozvojem průmyslu a zvyšujícím se životním standardem obyvatel se zvyšuje také spotřeba obalových a jiných spotřebních materiálů vyráběných z plastu. Do popředí se dostává otázka jak nakládat s plastovými materiály, které jsou obvykle ceněny pro svoji odolnost a trvanlivost po tom, co doslouží svému účelu nebo jsou jinak znehodnoceny. Jejich likvidace je mnohdy velmi náročná, proto se jejich koncentrace v prostředí zvyšuje. Spolu s ukládáním jiných odpadů, ať už záměrně v podobě skládek, či v důsledku havarijních úniků, či dlouhodobého zamořování prostředí v okolí velkých průmyslových areálů se tak po dlouhá léta vytváří v životním prostředí tzv. staré ekologické zátěže [5].

## **Materiál a metody**

### *Testované látky*

Jako testované látky byly použity 4 vzorky tekutých kultivačních médií, v kterých po dobu 6-ti týdnů kultivace probíhala biodegradace polymerů PETP/LA a PEA/CLA/CLO 60/40 pomocí *Aspergillus fumigatus* a *Candida guilliermondii*. Polyesteramidy (PEA) byly připraveny aniontovou polymerací  $\epsilon$ -caprolactonu (CLO) a  $\epsilon$ -caprolactamu (CLA). Polyester PETP/LA byly získány solvolýzou polyethylentereftalátu (PETP) s vodným roztokem kyseliny mléčné (LA) [1].

### *Kolorimetrický test*

V kolorimetrickém testu byly jako testovací organismus použity bakterie kmene *Rhizobium meliloti*. Jsou to chemoorganotrofní gramnegativní aerobní tyčky s charakteristickou schopností tvořit hlízky na kořenech rostlin rodu *Fabaceae*.

### Princip a metodika

Základním hodnoceným kritériem je změna absorbance v čase v závislosti na přidaném objemu toxické látky měřitelná pomocí spektroskopu. Principem této změny je barevná přeměna projevující se po redukci tetrazoliového barviva MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) z původní světle žluté barvy na sytě fialovou při absenci toxické látky. Pokud dojde k inhibici metabolismu bakterií v přítomnosti toxické látky, dochází k barevné změně jen velmi málo nebo vůbec [2].

Před samotným testováním se jedna kolonie kmene z plotny s pevným YMA médiem přeočkuje do tekutého živného L-média a kultivuje se při 30 °C přes noc. Následující den se bakteriální suspenze odstředí v centrifuze předchlazené na 4°C při 4000 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant se odstraní a sediment se resuspenduje ve fosfátovém pufru na hodnotu E=0,3 při 550 nm. Do řady zkumavek se aplikuje testovaná látka ve vzrůstajícím množství a doplní destilovanou vodou tak, aby celkový objem byl 1,2 ml (viz tabulka č. 1). Následně se přidá do každé zkumavky 1 ml 0,1M pufru K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 1 ml připravené bakteriální suspenze. U takto připravených zkumavek se změří počáteční absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 550 nm a ihned poté se do každé z nich aplikuje 100 µl 3nM indikátoru MTT. Následně se provádí další měření po 30-ti a 60-ti minutové kultivaci ve vodní lázni o teplotě 30°C.

**Tabulka 1:** Příklad koncentrační řady pro test na *Rhizobium meliloti*

Číslo zkumavky	Toxická látka (µl)	Destilovaná voda (µl)	Fosfátový pufr (µl)	Bakteriální kmen (µl)	Indikátor MTT (µl)
1	-	1200	1000	1000	100
2	10	1190	1000	1000	100
3	50	1150	1000	1000	100
4	150	1050	1000	1000	100
5	300	900	1000	1000	100
6	500	700	1000	1000	100
7	750	450	1000	1000	100
8	1000	200	1000	1000	100
9	1200	-	1000	1000	100
10	-	1200	1000	1000	100
11	-	3200	-	-	-

#### Výpočet

Při zpracování a vyhodnocování výsledků byla použita lineární regrese závislosti změny absorbance na koncentraci toxické látky. Výpočet hodnoty IC<sub>50</sub> byl proveden podle vzorce (1).

$$IC_{50} = \frac{\frac{Y}{2} - B}{m} \quad (1)$$

kde:

Y.....hodnota absorbance kontroly (hodnot zkumavek č. 1 a 10)

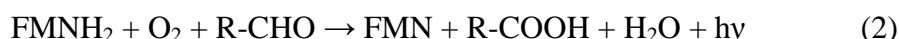
B.....průsečík regresní přímky s osou y

m.....sklon regresní přímky

#### Luminiscenční test

Jako druhý testovací organismus sloužily luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*. Jsou to fakultativně anaerobní gramnegativní tyčkovité bakterie s bičíky a se schopností emise

světla o vlnové délce 450-490 nm v modro-zelené viditelné oblasti. Mechanismus bioluminiscence je založen na přítomnosti specifického bakteriálního enzymu luciferázy, katalyzující reakci spojenou s vyzářením světla podle rovnice (2) [4].



### Princip a metodika

Principem testu je stanovení inhibice luminiscence emitované mořskými světélkujícími bakteriemi za přítomnosti různé koncentrace toxické látky. Inhibiční účinek testované látky se stanovuje přidáním různých koncentrací látky k suspenzi luminiscenčních bakterií. Provedení testu spočívá v přípravě koncentrační řady toxické látky metodou dvojkového ředění, kdy ve zkumavce č. 10 je nejvyšší koncentrace testované látky, tedy 50-ti procentní, která vznikne přidáním 2 ml testované látky ke 2 ml 2% roztoku NaCl. Následně se přepipetují 2 ml obsahu zkumavky č. 10 do zkumavky č. 2 a opět se smíchají se 2 ml 2% NaCl, takto se postupuje až do zkumavky č. 2. Do zkumavky č. 1, která slouží jako kontrola, se testovaná látka nepřidává. Luminiscence se měří luminometrem LUMIStox 300 bezprostředně před přidáním zkoumané látky, poté po 15-ti a naposledy po 30-ti minutové inkubaci v termobloku při teplotě 15°C již s přidanou testovanou látkou.

### Výpočet:

Pomocí regresní analýzy se pro každou expozici vypočte závislost účinku na koncentraci. Z rovnice regrese se vypočítá logaritmus koncentrace pro inhibici 50% a odlogaritmováním této hodnoty získáme hodnotu EC<sub>50</sub> [3].

### **Výsledky a diskuze**

Testování vzorků bylo provedeno pomocí testu akutní toxicity na bakteriích *Rhizobium meliloti* a *Vibrio fischeri*. Testy byly vždy provedeny nejméně ve dvou opakováních. Výsledky kolorimetrického testu toxicity jsou uvedeny v tabulce 2, výsledky luminiscenčního testu jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 2:** Výsledky kolorimetrického testu

Číslo vzorku	Plast	Degradační organismus	IC50 (v ppm)
1	PETP/LA fibre	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.031±0.259
3	PEA/CLA/CLO 60/40	<i>Aspergillus fumigatus</i>	5.596±2.216
5	PEA/CLA/CLO 60/40	<i>Candida guilliermondii</i>	3.605±0.206
6	PETP/LA fibre	<i>Candida guilliermondii</i>	-

**Tabulka 3:** Výsledky bioluminiscenčního testu

Číslo vzorku	Plast	Degradační organismus	EC50 (15 min) (v %)	EC50 (30min) (v %)
1	PETP/LA fibre	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4.96±1.22	3.67±1.46
3	PEA/CLA/CLO 60/40	<i>Aspergillus fumigatus</i>	3.78±1.21	2.71±0.28
5	PEA/CLA/CLO 60/40	<i>Candida guilliermondii</i>	14.40±1.44	10.65±2.07
6	PETP/LA fibre	<i>Candida guilliermondii</i>	4.55±1.23	3.43±1.09

Většina vzorků nesla poměrně výrazné zbarvení od žlutooranžové až po sytě hnědou. Zbarvení se negativně projevilo při odečtu výsledků kolorimetrického testu, přičemž vzorek č. 6 byl nejtmavší a proto v podstatě nehodnotitelný. U luminiscenčního testu je zohledněn faktor pro korekci zbarvení testované látky, proto se zbarvení vzorků negativně neprojevilo. Nejtoxičtější vzorek se v testu na *R. meliloti* jevil vzorek č. 1, podle výsledků testu na *V. fischeri* byl nejtoxičtější vzorek č. 3.

### **Závěr**

Na základě provedení testů byla zjištěna toxicita všech testovaných látek pocházejících z roztoků kultivačních médií po biodegradaci plastů pomocí mikroorganismů. Po přihlednutí k získaným výsledkům a zohlednění zbarvení výchozích testovaných látek se jako vhodnější testovací metodika prokázal bioluminiscenční test na bakteriálním kmeni *Vibrio fischeri*.

### **Literatura**

- [1.] NOVOTNÝ, Č., SEZIMOVÁ, H., MALACHOVÁ, K. a kol., *Screening of microorganisms for biodegradation of aromatic-aliphatic co-polyesters and polyesteramides*. Poster
- [2.] BOTSFORD J. L., *A Simple Assay for Toxic Chemicals Using a Bacterial Indicator*. World Journal of Mikrobiology and Biotechnology, 1998, Vol 14, pp. 369-376
- [3.] ČNS EN ISO 11348-1, *Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi Vibrio fischeri (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) – Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi*. 2009, Česká technická norma, Český normalizační institut, Praha
- [4.] Světová encyklopedie [online]. [cit. 18.3.2014]. Dostupné na [www: http://cs.swewe.com/word\\_show.htm/?32806\\_1&Luminiscen%C4%8Dn%C3%AD%7Cbakterie](http://cs.swewe.com/word_show.htm/?32806_1&Luminiscen%C4%8Dn%C3%AD%7Cbakterie)
- [5.] VANÍČEK, I. *Sanace skládek, starých ekologických zátěží*. ČVUT, Praha 6 2002, vydání první, 247 s., ISBN 80-01-024-38-5

### **Abstract**

The aim of the study was to assess the suitability of two selected bacterial ecotoxicological tests for the evaluation of toxicity of plastics biodegradation products. Selected ecotoxicity tests were colorimetric test for bacteria of the genus *Rhizobium meliloti* and exam with the luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. In both cases, inhibition of the metabolic pathways of bacteria was observe. Inhibition depends on the toxicity of the test substance, which in the case of *R. meliloti* bacteria manifested as inhibition of reduction of dye added, and in the case of *V. fischeri* there is a loss of light emission depending on the concentration of toxic substances. By the performed tests the acute toxicity of compounds in samples of plastic products after biodegradation by microorganisms was detected.