

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 08. ochrana a tvorba životního prostředí

Izolace mikroorganismů biodegradujících diklofenak

Jan Beránek

Kraj: Praha

Praha 2016

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 08. ochrana a tvorba životního prostředí

Izolace mikroorganismů biodegradujících diklofenak

Isolation of microorganisms biodegrading diclofenac

Autor: Jan Beránek

**Škola: Gymnázium, Praha 2, Botičská 1
Botičská 1, 128 01 Praha 2**

Ročník 3.

Kraj: Praha

**Konzultant: Mgr. Vlasta Čepelová,
RNDr. Andrea Palyzová, Ph.D.**

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci SOČ vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Andrey Palyzové, Ph.D., a Mgr. Vlasty Čepelové. Dále prohlašuji, že jsem práci vypracoval pomocí legálního programového vybavení a že jsem uvedl pouze veškeré použité zdroje informací.

V Praze

.....
Jan Beránek

Poděkování

Moc děkuji všem pracovníkům laboratoře enzymových technologií mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR za možnost provedení praktické části této práce. Zvláště děkuji RNDr. Andree Palyzové, Ph.D., za její odbornou pomoc s experimenty, za to, že mi dodala odbornou literaturu a za její připomínky k této práci.

Dále děkuji RNDr. Heleně Marešové, CSc., a RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc., za jejich pomoc v oblasti molekulární mikrobiologie.

Děkuji i Mgr. Vlastě Čepelové za vedení a připomínky k práci a Ing. Evženu Markalousovi za technickou pomoc.

Anotace

Životní prostředí je v současné době znečištěno velkým množstvím různých polutantů, látek vytvořených člověkem. Jednou ze skupin takových látek jsou léčiva, jejichž přítomnost byla prokázána v povrchových i podzemních vodách a v půdě. V průběhu této práce jsem se snažil najít mikroorganismus, který dokáže biodegradovat konkrétní léčivo, diklofenak. Pomocí klasických mikrobiologických metod jsem ze vzorků kontaminované půdy izoloval mikroorganismy rostoucí v médiu doplněném diklofenakem a našel jsem několik takových kmenů bakterií, které jsem molekulárně genetickými metodami zařadil do kmene *Pseudomonas putida*.

Klíčová slova: diklofenak, biodegradace, *Pseudomonas putida*

Annotation

Pharmaceutical drugs and their metabolites are part of environmental pollution. Their presence is proven in surface and underground waters and in soil. I have been looking for a microorganism, which would be able to utilize and biodegrade diclofenac, common drug. I have been using methods common in microbiology for isolation such microorganisms from contaminated soil. I have found a few bacterial species which are able to do so; these species have grown in medium supplemented with diclofenac. Using molecular genetic methods I have taxonomically determined that found organisms belong to specie *Pseudomonas putida*.

Key words: diclofenac, biodegradation, *Pseudomonas putida*

Obsah

| | |
|--|----|
| Úvod | 7 |
| 1 Přehled literatury | 8 |
| 1.1 Biodegradace polutantů..... | 8 |
| 1.1.1 Polutanty..... | 8 |
| 1.1.2 Bioremediace..... | 9 |
| 1.2 Léčiva..... | 9 |
| 1.2.1 Výskyt léčiv v prostředí..... | 10 |
| 1.2.2 Ekotoxicita léčiv | 11 |
| 1.2.3 Odstranění léčiv z prostředí | 11 |
| 1.2.4 Diklofenak..... | 12 |
| 1.3 Identifikace bakteriálního izolátu pomocí srovnávání genů 16S rRNA... 13 | |
| 2 Metodika..... | 15 |
| 2.1 Media a roztoky | 15 |
| 2.1.1 Kultivační media | 15 |
| 2.1.2 Roztoky..... | 16 |
| 2.1.3 Pufry | 16 |
| 2.2 Laboratorní postupy..... | 17 |
| 2.2.1 Odběr vzorků..... | 17 |
| 2.2.2 Kultivace mikroorganismů z kontaminované půdy | 17 |
| 2.2.3 Detekce izolátů na pevném mediu s diklofenakem | 17 |
| 2.2.4 Screening izolátů na utilizaci diklofenaku | 18 |
| 2.2.5 Stanovení koncentrace buněk | 18 |
| 2.2.6 Stanovení koncentrace diklofenaku | 18 |
| 2.2.7 Izolace chromozomální DNA..... | 19 |
| 2.2.8 Elektroforetická analýza DNA..... | 20 |
| 2.2.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 20 |
| 2.2.10 Sterilizace..... | 21 |
| 2.2.11 Centrifugace | 21 |
| 2.2.12 Příprava konzerv..... | 21 |

| | | |
|-----|--|----|
| 3 | Výsledky | 22 |
| 3.1 | Kultivace mikroorganismů z kontaminované půdy | 22 |
| 3.2 | Detekce izolátů na pevném mediu s diklofenakem | 22 |
| 3.3 | Screening izolátů na utilizaci diklofenaku..... | 24 |
| 3.4 | Spektrofotometrické stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku | 25 |
| 3.5 | Taxonomické určení pozitivních izolátů..... | 28 |
| 4 | Diskuse | 31 |
| 5 | Závěr | 34 |
| 6 | Seznam literatury..... | 35 |
| 7 | Seznam obrázků | 37 |
| 8 | Seznam grafů | 38 |
| 9 | Seznam tabulek..... | 39 |

Úvod

Vzhledem k tomu, že celosvětová produkce a spotřeba léčiv stoupá, začala se léčiva dostávat do všech složek životního prostředí. Jejich přítomnost je doložena v půdě a ve vodním prostředí. Proto jsou farmaka aktuálně jedním z polutantů, jejichž sledování v prostředí je vyžadováno. Koncentrace farmak se sledují zejména ve vodním prostředí. V poslední době se ukazuje jako účinná cesta pro degradaci těchto polutantů využití bakteriálních konsorcií nebo čistých kultur vybavených enzymovým systémem schopným katabolizovat daný polutant.

Toto téma jsem si pro svou práci SOČ vybral, protože mě zajímá degradace xenobiotik pomocí mikroorganismů, a proto, že přítomnost léčiv v životním prostředí je reálná hrozba, kterou bychom ve vlastním zájmu neměli ignorovat. Také jsem se v rámci projektu Otevřená věda Praha zúčastnil studentské vědecké stáže na toto téma.

Cílem mé práce je nalézt a kultivovat mikroorganismus schopný degradovat diklofenak, což je účinná látka v některých lécích, které tlumí bolest, záněty či otoky při různých kožních problémech a dokázat, že je diklofenak skutečně degradován. Zároveň chci poukázat na významnou roli takového mikroorganismu v biodegradaci diklofenaku.

1 Přehled literatury

1.1 Biodegradace polutantů

Degradaci látek lze považovat za proces, který vede ke zjednodušení jejich struktury působením fyzikálních, chemických a biologických faktorů. V případě biodegradace převažují biologické faktory nad abiotickými. Biodegradace je biologické odbourávání organických látek, a to jak přírodních, tak těch, které mají antropogenní původ, což znamená, že se do životního prostředí dostaly kvůli lidské činnosti. Většinu těchto látek nazýváme polutanty. Biodegradaci provádějí zpravidla mikroorganismy, protože mají ve srovnání s vyššími organismy rozmanitější metabolismus a enzymové vybavení. Organické látky mohou být biotransformovány nebo přes řadu meziproduktů rozloženy až na jednoduché anorganické látky jako oxid uhličitý a vodu – v takovém případě hovoříme o mineralizaci. Účinnost biodegradace organické látky je významnou měrou ovlivněna samotnou chemickou strukturou sloučeniny. Přítomnost určitých charakteristických skupin (-COOH, -OH, -Cl apod.) může rozklad polutantu za určitých podmínek usnadňovat nebo naopak ztěžovat. (1)

Se strukturou molekuly souvisí také fyzikálně-chemické vlastnosti molekul. Jednou z klíčových vlastností je např. hydrofobicita (špatná rozpustnost ve vodě, naopak dobrá rozpustnost v tučích a organických rozpouštědlech), která se částečně podílí na škodlivosti polutantu v prostředí. (1)

1.1.1 Polutanty

Slovo „polutant“ pochází z latinského *polluo*, což znamená znečišťovat. Pod pojmem polutant se rozumí látka, která má nepříznivé účinky na určité složky životního prostředí. Může být uměle vyrobena člověkem (pokud zároveň není přirozenou součástí živých organismů, označujeme ji jako xenobiotikum) nebo vznikat přírodními pochody. Polutantem se stává, pokud se na daném místě vyskytuje v nežádoucím množství. Jako polutanty se označují pevné, kapalné nebo plynné látky, které mají v životním prostředí škodlivý vliv na živé organismy. Často jsou to látky antropogenního původu. Charakteristickými vlastnostmi polutantů je jejich toxicita a u některých možnost bioakumulace (hromadění v potravinovém řetězci) nebo odolnost vůči rozkladu. (1)

Některé toxické organické látky jsou označovány jako perzistentní organické polutanty. Jsou rozkládány obtížně a pomalu, a proto setrvávají v přírodě velmi dlouhou dobu. Hromadí se v těle organismů a v potravním řetězci vlivem dálkového přenosu mohou být široce rozšířené. Mezi persistentní polutanty patří např. pesticidy (DDT – 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan, HCH – hexachlorcyklohe-

xan...), chemikálie využívané v chemickém průmyslu (např. PCB – polychlorované bifenyly) a některé odpadní produkty chemické výroby. (1)

1.1.2 Bioremediace

Mnoho organismů má enzymovou výbavu, díky které mohou odbourávat některé polutanty. To pro ně může být výhodné, mohou tím získat další zdroj uhlíku a energie. Produkty metabolismu polutantu však mohou být toxičtější než původní polutant, což má negativní vliv na daný organismus. Z organismů, které mohou degradovat polutanty, jsou nejdůležitější bakterie. Ty dokážou polutanty často rozložit beze zbytku. O bakteriálním metabolismu polutantů většinou platí, že geny pro potřebné enzymy jsou častěji přítomny na plasmidech, které si bakterie mohou předávat konjugací; méně často jsou na chromozomu. Často jsou také regulovány – zapíná je přítomnost polutantu, naopak je vypíná přítomnost jednodušeji využitelné potravy. (2)

Proces, při kterém jsou degradující organismy využity pro vyčištění znečištěného prostředí, se nazývá bioremediace. Je to cílená biodegradace toxických látek nebo xenobiotik, nejčastěji pomocí rozsáhlých mikrobiálních konsorcií bakterií a hub, které přímo nebo nepřímo rozkládají a využívají řadu přirozených organických látek. (3) K tomu, aby se uskutečnila bioremediace polutantu v kontaminovaném prostředí, musí být splněny určité předpoklady, za kterých dojde k transformaci organické látky:

- přítomnost organismu s vhodnou enzymatickou výbavou pro degradaci polutantu v kontaminovaném prostředí
- schopnost těchto organismů transformovat organický polutant
- při degradaci vzniká látka (meziprodukt), která nesmí být v dosažené koncentraci toxická pro degradující organismus
- při využití mikroorganismů též dostupnost polutantů mikroorganismům – možnost proniknutí polutantu přes membránu (využití intracelulárních nebo extracelulárních enzymů)
- úprava fyziologických podmínek kontaminovaného prostředí pro rychlé množení populace organismu (anorganické živiny, kyslík nebo jiné vhodné akceptory elektronů, stopové prvky, teplota, pH, zdroj uhlíku a energie, induktor katabolické dráhy)
- nepřítomnost další chemické látky potlačující růst nebo metabolickou aktivitu degradační mikroflóry v kontaminované lokalitě.(3)

1.2 Léčiva

Jako léčiva jsou souhrnně označovány léčivé látky a léčivé přípravky, které slouží k léčení, prevenci nebo zmírnění projevů nemocí. (4)

Léčivé látky jsou podle zákona č. 378/2007 Sb. definovány jako látky nebo směsi látek používané při přípravě léčivých přípravků, které se stanou účinnou složkou léčivého přípravku. Tyto látky mohou být původu lidského, živočišného, rostlinného nebo chemického. Dále tento zákon definuje pomocnou látku, což je jakákoli složka léčivého přípravku, která není ani léčivou látkou ani obalem. (5) Místo označení „léčivá látka“ je možno použít zkratku API z anglického „active pharmaceutical ingredient“ – česky „aktivní farmaceutická substance.“

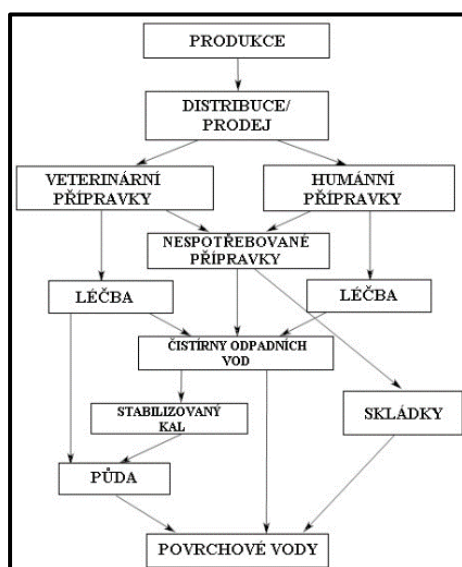
Léčiva lze dělit na základě jejich odolnosti vůči životnímu prostředí do tří skupin:

- látky lehce odbouratelné
- látky špatně odbouratelné a hydrofilní
- látky špatně odbouratelné a hydrofobní

Pro životné prostředí jsou nejnebezpečnější látky ze třetí skupiny, které se mohou kumulovat v potravních řetězcích. Zvláštní skupinou jsou pak léčiva – xenobiotika, která mohou narušit činnost živých organismů. Mezi nejvýznamnější látky této skupiny patří estrogény, antibiotika a nesteroidní antiflogistika. (4)

1.2.1 Výskyt léčiv v prostředí

Distribuce léčiv do životního prostředí se liší v porovnání s tradičními polutanty. Primárním zdrojem odpadních léčiv a jejich metabolitů jsou pacienti. V Evropě se denně spotřebují miliony balení léčiv, které obsahují přes 3 000 různých léčivých látek. Tyto látky jsou v lidském či zvířecím těle metabolizovány, a jejich metabolity, ale i zbytky léčivých látek odchází z organismu močí do odpadních vod (obrázek 1). (4)



Obrázek 1 – tok léčiv nebo jejich metabolitů do životního prostředí (4)

Naneštěstí procesy používané při čištění odpadních vod nejsou někdy schopné tyto látky účinně zachytit, a tak se léčiva dostávají do životního prostředí. Nejexponovanějšími částmi vodního prostředí bývají povrchové vody, kde byla detekována např. zvýšená koncentrace ($\mu\text{g/l}$) antibiotik a hormonů. Metabolity léčiv byly zaznamenány prakticky ve všech složkách životního prostředí (půda, podzemní a povrchové vody), a to v širokém koncentračním rozmezí od 1 ng/l po 1 mg/l. (4)

V České republice byl proveden výzkum, který v rizikových oblastech potvrdil výskyt často používaných léčiv v pitné vodě, ale jen v nízkých koncentracích, které zatím patrně nemají nežádoucí vliv na lidské zdraví. (6)

1.2.2 Ekotoxicita léčiv

Ekotoxicita, tedy toxické působení na životní prostředí nebo na živé organismy, je u každého léčiva individuální, protože ji ovlivňuje mnoho faktorů. O působení léčiva na lidský organismus máme dostatek informací, známe jejich kladné i nežádoucí účinky, neboť v této oblasti podléhají farmaka přísné kontrole, obzvláště v zemích EU. (4; 7)

Testování ekotoxicity probíhá tak, že se vytvoří prostředí s modelovým organismem, do kterého se umístí známá koncentrace látky, jejíž ekotoxicitu chceme zkoumat. Používá se více modelových organismů, používají se zástupci prokaryot a jednobuněčných i mnohobuněčných eukaryot. Modelový organismus se vystaví po stanovenou dobu známé koncentraci zkoumané látky, a po skončení experimentu se porovnává s jedincem či kolonií prokaryot, která vystavena nebyla. Obecně platí, že prokaryota jsou na koncentrace zkoumaných látek nejcitlivější. (7)

Pravděpodobně nejdůležitější skupiny léčiv z hlediska jejich ekotoxicity jsou antibiotika a hormony. Přítomnost antibiotik v prostředí může vyvolávat rezistenci patogenních bakterií vůči nim, což by mělo zásadní dopad na jejich léčbu. Přítomnost hormonů v prostředí je rovněž nežádoucí; v Kanadě byl proveden výzkum, v němž byla populace ryb (střevlí) vystavena 17β -ethynylestradiolu v koncentraci 5 ng/l. Samcům zkoumaných ryb se změnilo pohlaví a samicím se snížila schopnost reprodukce, a tím byla zkoumaná populace odsouzena k zániku. (7)

1.2.3 Odstranění léčiv z prostředí

Existuje několik způsobů, jak se léčiva odstraňují z životního prostředí. První z nich je fotolýza – molekula léčiva je zasažena slunečním zářením a rozpadne se na jednodušší molekuly. Tento způsob degradace je nejčastější ve vzduchu a ve vodním prostředí – těžko se takto rozloží molekula polutantu, která se nachází v půdě v hloubce 20 cm. Další je radikálový rozpad, kdy je molekula farmaka rozložena

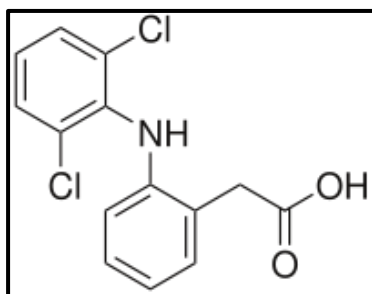
působením silných oxidačních činidel, ta se však v přírodě nevyskytují příliš často. (4)

V čistírnách odpadních vod se používá tzv. sorpce na aktivovaný kal. Skládá se ze dvou dějů, absorpce, kdy se hydrofobní molekuly léčiv vážou na hydrofobní části membrán mikroorganismů v kalu a na jiné hydrofobní části kalu. Druhý děj, adsorpce, probíhá díky působení elektrostatických sil mezi kladně nabitými molekulami léčiv a záporně nabitým povrchem biomasy. (4)

Další možností odstranění léčiv z prostředí je biodegradace, tedy přeměna molekul léčiv na jednodušší látky působením mikroorganismů v aktivovaném kalu. V čistíčkách odpadních vod se však léčiva biodegradují jen částečně, protože jsou v odpadní vodě přítomny jen v nízkých koncentracích. (4)

1.2.4 Diklofenak

Diklofenak, chemickým názvem 2-[2-(2,6-dichlorfenylamino)-fenyl]octová kyselina, je bílá pevná látka s relativně nízkou hustotou. Je hydrofobní, tedy špatně rozpustný ve vodě (2,37 mg/l) (8).



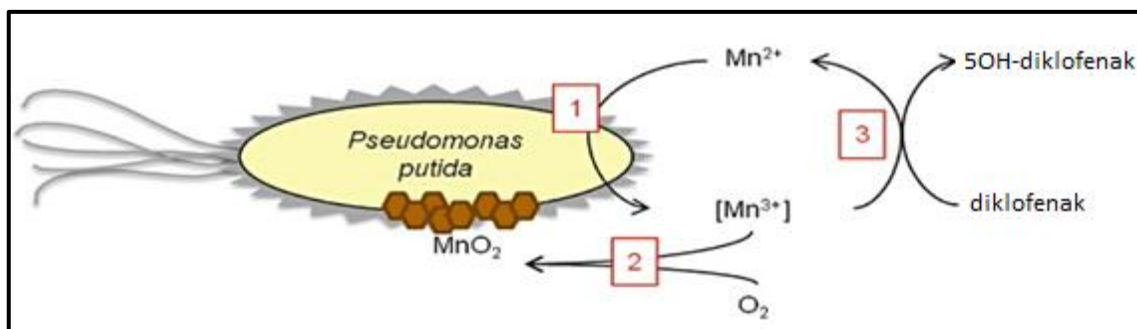
Obrázek 2 – strukturní vzorec diklofenaku (10)

Diklofenak je běžné nesteroidní a protizánětlivé léčivo. Používá se ve farmaceutickém průmyslu jako účinná látka hlavně v přípravcích proti kožním zánětlivým onemocněním, otokům, dně či akutním migrénám. (8)

Léčiva a hormony jsou v Evropské unii velmi aktuálním tématem. V roce 2013 byl diklofenak přidán na tzv. watchlist, tedy seznam látek, jejichž koncentrace v povrchových vodách by členské státy měly sledovat. Koncentrace diklofenaku v odpadních vodách se v různých státech velmi liší, takže je obtížné stanovit průměrnou hodnotu. V odpadních vodách se pohybují mezi 0,12 a 4,7 µg/l a postupně se zvyšují, takže dnes je diklofenak jedním z nejčastěji detekovaných léčiv vůbec. V pitných vodách se jeho koncentrace pohybují nejvýš těsně nad limity sledovatelnosti (1–7 ng/l). (8)

Střední hodnoty jeho ekotoxicity v testech s *Daphnia magna* (hrotnatka velká) kolísají mezi 22 a 80 mg/l. Nicméně počítat jen s testy úmrtnosti hrotnatek by znamenalo podcenit skutečnou toxicitu diklofenaku. Na základě studií, které zahrnovaly i dlouhodobé vystavení modelových organismů diklofenaku, byla vypočtena hodnota koncentrace, která pravděpodobně nebude mít žádný vliv na živé organismy. Ta se rovná 116 µg/l, což je tisícinásobek hodnoty obvykle naměřené v prostředí. Jako další modelový organismus byl použit *Oncorhynchus mykiss* (pstruh duhový), který byl vystaven diklofenaku o koncentraci 1 µg/l po dobu 28 dní. Poškodila se mu játra, ledviny a žábry. (8) Diklofenak působí negativně i na obratlovce, způsobuje poškození ledvin a gastrointestinálních tkání. (9)

Některé mikroorganismy (např. nitrifikační bakterie, *Pseudomonas putida*, *Bacillus sp.*) dokážou se svojí enzymovou výbavou rozkládat molekulu diklofenaku, která jim slouží jako zdroj uhlíku a energie. Nitrifikační bakterie k degradaci diklofenaku využívají enzym monooxygenázu. *Pseudomonas putida* a *Bacillus sp.* degradují diklofenak v závislosti na oxidaci Mn^{2+} na Mn^{4+} přes intermediát Mn^{3+} , kdy se degradace diklofenaku objevuje jako vedlejší metabolický proces. Na obrázku 3 je popsán třífázový systém oxidace manganu z Mn^{2+} na Mn^{4+} (MnO_2), který se zabuduje do buněčných stěn bakteriálních buněk a oxiduje diklofenak na 5-hydroxydiklofenak. (10)



Obrázek 3 – oxidace Mn^{2+} a degradace diklofenaku jako spřažená reakce. (10)

1.3 Identifikace bakteriálního izolátu pomocí srovnávání genů 16S rRNA

16S rRNA je součástí malé podjednotky prokaryotického ribozomu. Pořadí jejích nukleotidů je kódováno v příslušném úseku 16S rDNA daného mikroorganismu. Tento úsek genetické informace prokaryot je evolučně starý a prochází postupnými změnami, čehož lze dnes využít při identifikaci mikroorganismů, při níž se 16S rDNA izolátu srovnává s úseky 16S rDNA v databázi. V případě shody sekvence 16S rDNA izolátu s některým mikroorganismem v databázi se potvrdí, že tyto mikroorganismy jsou evolučně příbuzné. Kvůli náhodným mutacím v 16S rDNA je

shoda obou sekvencí málokdy stoprocentní, nicméně když se shoduje například 90–95 % nukleotidů, je stále možné považovat identifikaci za přesnou. (11)

Proces identifikace bakteriálního izolátu se skládá z izolace jeho chromozomální DNA, následně je nutno pomocí PCR zvětšit podíl 16S rDNA ve vzorku, který je poté nutno osekvenovat, tedy stanovit pořadí nukleotidů, a porovnat s databází. (2; 11)

Výhodou této metody identifikace je vysoká přesnost, přestože v některých případech není možné mikroorganismus pomocí této metody zařadit do konkrétního kmene. Nevýhodami tohoto procesu jsou materiální a časová náročnost (několik dní). (2)

2 Metodika

2.1 Media a roztoky

2.1.1 Kultivační media

Pro kultivaci mikroorganismů z odebraných vzorků jsem použil následující média:

2.1.1.1 Luria - Broth medium (LB)

Navážené složky (Trypton, Yeast extract a NaCl) jsem rozpustil v 1 000 ml destilované vody a pH jsem upravil pomocí pH sondy na hodnotu 7,2 pomocí 40% roztoku KOH. Poté jsem je nechal sterilizovat v autoklávu. Následně jsem je nechal zchladit na teplotu 50 °C. Pro přípravu pevné půdy na Petriho misce jsem ještě před sterilizací přidal do média 18 g agaru (Oxoid).

- Trypton (Oxoid)10 g
- Yeast extract (BD - Difco) 5 g
- NaCl (Lachema)10 g

2.1.1.2 Basal salts Broth medium (BSB)

- NaCl 0,1 g
- K₂HPO₄ 1,03 g
- KH₂PO₄ 0,75 g
- NH₄Cl 1 g

Tyto sloučeniny navážené na analytických vahách jsem smíchal a rozpustil v 1 000 ml destilované vody. Po sterilizaci jsem medium ochladil a doplnil zásobními roztoky stopových prvků v následujících množstvích:

- MgSO₄ · 7H₂O 1 000 µl/100 ml
- CaCl₂ · 2H₂O 200 µl/100 ml
- ZnSO₄ · 7H₂O 100 µl/100 ml
- MnSO₄ · 1H₂O 10 µl/100 ml
- FeSO₄ · 7H₂O 100 µl/100 ml
- CoCl₂ · 6H₂O 100 µl/100 ml
- CuSO₄ · 5H₂O 100 µl/100 ml

V případě přípravy pevné půdy jsem do media před sterilizací přidal 20 g agaru (Oxoid) do 1 000 ml, a to z důvodu nižší viskozity minimálního média.

2.1.2 Roztoky

2.1.2.1 Zásobní roztoky

Zásobní roztoky stopových prvků jsem připravoval rozpuštěním daného množství látky ve 100 ml destilované vody a nechal je sterilizovat v autoklávu.

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema)..... 2 g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Lachema) 0,5 g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema)..... 0,66 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Lachema)..... 0,170 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema)..... 0,15 g
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Lachema) 0,0483 g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Lachema)..... 0,0471 g

2.1.2.2 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok jsem používal při výsevu bakteriální kultury v příslušném ředění.

- NaCl (Lachema)..... 9 g/l

2.1.2.3 Roztok methylenové modři

0,032 g methylenové modři jsem navážil na analytických vahách přímo do skleněné lahvičky a rozpustil ve 100 ml destilované vody.

2.1.2.4 Roztok octanu měďnatého

2 g octanu měďnatého jsem navážil na analytických vahách přímo do skleněné lahvičky a rozpustil ve 100 ml směsi destilované vody a koncentrované kyseliny octové v poměru 9:1.

2.1.3 Pufry

2.1.3.1 Amonný pufr

14,717 g NH_4Cl (Lachema) jsem navážil a rozpustil ve 100 ml destilované vody. pH jsem upravil pomocí 25% roztoku NH_3 na hodnotu 9,4.

2.1.3.2 Octanový pufr

1,4 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Lachema) jsem navážil a rozpustil ve 100 ml destilované vody. pH jsem upravil pomocí 0,2M kyseliny octové na 5,3.

2.1.3.3 TBE pufr

Použil jsem pufr složený ze 45mM Tris-HCl, 45mM H₃BO₃, 1mM EDTA, jehož výsledné pH bylo rovno 8,0.

2.1.3.4 GLB pufr

Použil jsem pufr složený ze 40% roztoku sacharózy a 0,05% bromfenolové modři.

2.2 Laboratorní postupy

2.2.1 Odběr vzorků

Pro screeningové metody jsem použil vzorky kontaminované půdy ze skládky čistíčky odpadních vod (středočeský kraj, Česká republika). Vzorky byly odebrány sterilně z hloubky 10 a 30 cm pod povrchem. Vzorky jsem uchovával při teplotě -80 °C.

2.2.2 Kultivace mikroorganismů z kontaminované půdy

5 gramů kontaminované půdy jsem nechal třepat ve 100 ml LB media s diklofenakem; diklofenak jsem podal v pevné formě – přisypal do media v množství 1 g/l. Třepal jsem ve sterilních baňkách, v kultivačním boxu při teplotě 28°C, na třepačce nastavené na 200 ot/min. Po 24 hodinách kultivace jsem provedl 1. pasáž, 5 ml roztoku jsem přenesl do 100 ml sterilního BSB média s diklofenakem v koncentraci 1 g/l. Toto médium jsem nechal dále kultivovat. Jediným zdrojem uhlíku v médiu byl diklofenak. Po dalších 48 hodinách jsem provedl 2. pasáž stejným způsobem.

Pro kontrolu jsem kultivoval i vzorky kontaminované půdy bez diklofenaku. Postupoval jsem stejným způsobem s oběma vzorky půd, které jsem kultivoval v LB mediu bez přidaného diklofenaku.

2.2.3 Detekce izolátů na pevném mediu s diklofenakem

Po 72 hodinách jsem vyséval z baňky s půdou na Petriho misky s médii LB+DF (1 g/1000 ml) a BSB+DF (1 g/1 000 ml) pomocí ředící řady. Používal jsem skleněné zkumavky. Na pevné médium jsem napipetoval 100 µl kultury ředěné 10⁻⁵, 10⁻⁶ a 10⁻⁷ a pomocí sterilní skleněné hokejky jsem suspenzi rozmístil po celé misce. Kontrolní vzorky kultivované bez diklofenaku jsem vyséval stejným způsobem, ale na misky bez diklofenaku a s vyšším ředěním, protože jsem očekával silnější nárůst.

2.2.4 Screening izolátů na utilizaci diklofenaku

Izoláty jsem zaočkovával do tekutého BSB media doplněným koncentracemi diklofenaku (1 g a 2 g/l). Izoláty jsem kultivoval ve 100 ml baňkách s mediem na třepačce (200 ot/min) v kultivačním boxu při teplotě 28 °C.

2.2.5 Stanovení koncentrace buněk

Během kultivace jsem měřil hustotu kultury při vlnové délce 600 nm spektrofotometrem firmy Pye Unicam Ltd., model SP30 – UV (Velká Británie). Vzorek jsem měřil ve 3 ml plastových kyvetách (d = 1 cm) proti blanku (destilovaná voda). Vzorky kultury jsem ředil tak, aby se hodnoty měřené optické denzity pohybovaly v rozsahu hodnot 0,1 – 0,6.

2.2.6 Stanovení koncentrace diklofenaku

Postupoval jsem dle literatury L. Čapka a spol. (2013) (12), kteří vypracovali metodu stanovení diklofenaku ve vodném roztoku pomocí UV/VIS spektrofotometrie.

2.2.6.1 Příprava kalibrační křivky

Připravil jsem dvě kalibrační křivky, jednu pro stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku pomocí methylenové modři, druhou pro stanovení octanem měďnatým. Pro určení první křivky jsem si nachystal roztoky čistého diklofenaku v destilované vodě, koncentrace diklofenaku u vzorků byly: 10, 20, 30 a 40 mg/l. Ke 2 ml těchto vzorků jsem vždy přidal 5 ml roztoku methylenové modři, 1 ml amonného pufru a 10 ml chloroformu. Směs jsem nechal třepat na třepačce při 200 ot/min po dobu 5 minut a odebral jsem organickou fázi.

Pro přípravu druhé křivky jsem opět použil roztoky čistého diklofenaku v koncentracích 2, 4, 6, 8, 10 a 20 g/l. K těmto vzorkům jsem přidal 3 ml roztoku octanu měďnatého, 4 ml octanového pufru a 2 ml chloroformu, směs jsem nechal 5 minut třepat na třepačce při 200 ot/min a odebral jsem organickou fázi.

Stanovil jsem extinkce organických fází vzorků, pro stanovení pomocí methylenové modři při vlnové délce 638 nm a pro stanovení pomocí octanu měďnatého při vlnové délce 680 nm. Měřil jsem proti destilované vodě.

2.2.6.2 Příprava vzorku pro stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku pomocí methylenové modři

Z jednotlivých kultur jsem do plastických kyvet odebral 5 ml suspenze. Vzorky jsem nechal centrifugovat (8 000 ot/min, 4 min) a odebral jsem supernatant (tekutou složku). Vzorek supernatantu o celkovém množství 4 ml jsem smíchal s methy-

lenovou modří (5 ml), amonným pufrem (1 ml) a chloroformem (10 ml). Směs jsem ponechal 5 minut na třepačce a následně jsem odebral organickou fáze, ve které jsem spektrofotometricky stanovil zbytkové množství diklofenaku.

2.2.6.3 Příprava vzorku pro stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku pomocí octanu měďnatého

Z jednotlivých kultur jsem do plastických kyvet odebral 5 ml suspenze. Vzorky jsem nechal centrifugovat (8 000 ot/min, 4 min) a odebral supernatant. Vzorek supernatantu o celkovém množství 2 ml jsem smíchal s octanem měďnatým (3 ml), octanovým pufrem (4 ml) a chloroformem (2 ml). Směs jsem nechal třepat 5 minut na třepačce (200 ot/min) a následně jsem odebral organickou fázi, ve které jsem spektrofotometricky stanovil zbytkové množství diklofenaku.

2.2.6.4 Spektrofotometrické stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku

Zbytkovou koncentraci diklofenaku jsem stanovoval v rozmezí 10–100 mg/l pomocí methylenové modři a v rozmezí 1–10 g/l pomocí octanu měďnatého. Hodnotu extinkce v maximu absorpčního spektra diklofenaku jsem měřil při vlnové délce 638 nebo 680 nm na spektrofotometru Shimadzu, model UV – 160 v kyvetách z křemenného skla. Vzorky jsem měřil proti chloroformu nebo médiu vytřepaném v methylenové modři jako blanku.

2.2.7 Izolace chromozomální DNA

Postupoval jsem podle pokynů uvedených v High Pure PCR Template Preparation Kitu (13), strana 12 a 14. Používal jsem roztoky a pufry z kitu.

Do 1,5 ml mikrozkušavky Eppendorf jsem přidal 400 µl bakteriální suspenze a nechal jsem ji centrifugovat po dobu tří minut při 5000 ot/min. Poté jsem pelet resuspendoval v pufru P1 s RNasou.

Přidal jsem 5 µl roztoku lysozymu (10 mg/ml v 10mM Tris-HCl, pH = 8) a nechal jsem směs inkubovat při 37 °C.

Ke směsi jsem přidal 200 µl Binding pufru a 40 µl roztoku proteinázy K a po promíchání nechal inkubovat po dobu deseti minut při teplotě 70 °C.

Ke směsi jsem následně přidal 100 µl isopropanolu a opět jsem směs zamíchal.

Připravenou směs jsem přepipetoval do filtrační kolonky ve sběrné zkumavce, po minutové centrifugaci při 12 000 ot/min jsem filtrační kolonku vložil do nové sběrné zkumavky a do filtrační kolonky přidal 500 µl Inhibitor Removal pufru. Po

opětovné centrifugaci za týchž podmínek jsem filtrační kolonku umístil do nové sběrné nádoby, do kolonky přidal 500 µl promývacího pufru a znovu centrifugoval po dobu jedné minuty při 12 000 ot/min. Tento promývací krok jsem opakoval a poté nechal filtrační kolonku ještě jednou centrifugovat kvůli odstranění zbylého promývacího pufru.

Nakonec jsem filtrační kolonku vložil do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky Eppendorf a navázanou DNA uvolnil 200 µl elučního pufru přehřátého na 70 °C. Po centrifugaci jsem purifikovanou DNA uchovával při teplotě -20 °C.

2.2.8 Elektroforetická analýza DNA

K detekci a analýze izolované DNA jsem použil horizontální agarózovou elektroforézu. Proces probíhal v pufru TBE, rozměr použitého agarózového gelu (koncentrace agarózy 1 %) byl 9×7,5 cm. Do gelu jsem přidal fluorescenční barvivo ethidium bromid (koncentrace ethidium bromidu 0,05 µg/ml) a ke vzorkům purifikované DNA jsem před nanesením na gel přidával GLB pufr. Proces probíhal při napětí 70-90 V, používal jsem zdroj EC 1000-90, E-C Apparatus Corporation. Výsledný elektroforetogram jsem snímal dokumentačním systémem Gel Logic 200 (Kodak) a upravoval pomocí softwaru Kodak MI - Molecular Imaging System.

2.2.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Reakce probíhala ve zkumavkách Eppendorf. Použil jsem automatický PCR cycler MJ Research PTC-200. Reakce probíhala v krocích podle tabulky 1.

25 µl reakční směs jsem namíchal z těchto složek: 5 µl Herculase pufru, 0,5 µl 10 mM dNTP (deoxynukleosid trifosfáty), 0,5 µl primeru FWD 27, 0,5 µl primeru REV 1492, 1 µl DMSO (dimethylsulfoxid), 1 µl chromozomální DNA, 0,2 µl enzymu Herculase II Fusion polymerázy a doplnil sterilní destilovanou vodou.

Tabulka 1 – program kroků pro PCR (tabulka autor)

| Krok | Teplota (°C) | Doba trvání (s) | Počet opakování |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------------|
| Úvodní denaturace | 98 | 120 | 1 |
| Denaturace | 98 | 20 | 35 |
| Nasedání primerů | 55 | 20 | |
| Polymerace | 72 | 60 | |
| Konečná polymerace | 72 | 600 | 1 |

2.2.10 **Sterilizace**

Roztoky i media jsem nechával sterilizovat v autoklávu po dobu 30 minut při přetlaku 0,1 MPa. Laboratorní sklo a plastový materiál jsem nechával sterilizovat po dobu 8 hodin při teplotě 100 °C.

2.2.11 **Centrifugace**

K odstředování objemů do 50 ml jsem používal chlazenou stolní centrifugu Eppendorf typ 5403 (8 000 ot/min po dobu 5 min) a Universal 32R (8 000 ot/min, 5 min).

2.2.12 **Příprava konzerv**

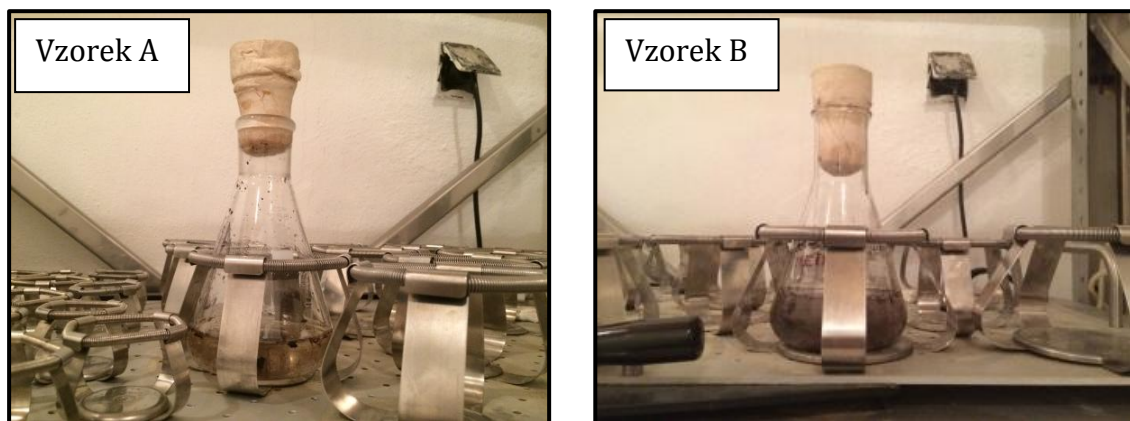
Všechny pozitivní izoláty jsem uchovával v konzervách s Tris/glycerolovým roztokem v poměru 0,7 ml:0,7 ml při teplotě -80 °C.

3 Výsledky

3.1 Kultivace mikroorganismů z kontaminované půdy

Pro izolaci mikroorganismů jsem použil dva vzorky kontaminované půdy, vzorek A odebraný z hloubky 10 cm a vzorek B odebraný z hloubky 30 cm pod povrchem v okolí skládky čistíčky odpadních vod ve středních Čechách. Vzorky jsem nechal třepat ve 100 ml sterilního LB média.

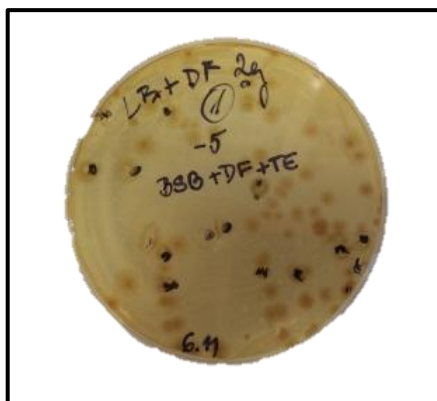
Po 24 hodinách kultivace jsem provedl 1. pasáž, při které jsem z každého média odebral 5 ml média s bakteriální kulturou a sterilně přenesl do sterilního BSB média s diklofenakem (1 g/l), abych se zbavil půdního sedimentu a zároveň působil selekčním tlakem na mikroorganismy. Na obrázku 5 jsou fotografie obou kultivovaných vzorků po 1. pasáži. Po dalších 48 hodinách jsem provedl 2. pasáž stejným způsobem. Narostlou kulturu jsem poté použil pro detekci izolátů na pevném médiu s diklofenakem.



Obrázek 4 – vzorky kontaminované půdy A a B v BSB mediu doplněném diklofenakem, po 1. pasáži (foto autor)

3.2 Detekce izolátů na pevném mediu s diklofenakem

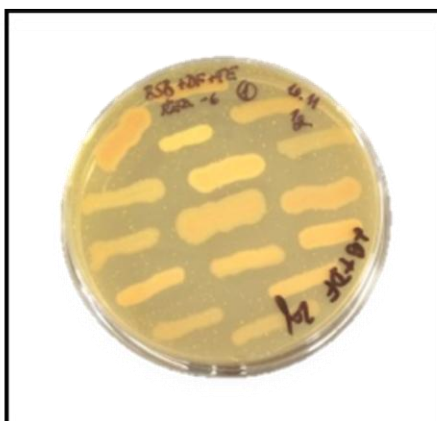
Pro získání jednotlivých monokoloniových bakteriálních izolátů jsem vyséval kultury z 1. a 2. pasáže na Petriho misky s LB a BSB médiem s diklofenakem v koncentraci 2 g/l za použití ředících řad (od 10^{-1} do 10^{-8}). U obou vzorků jsem použil ředění 10^{-2} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Ředění 10^{-2} jsem použil kvůli nízkému nárůstu kultury u vzorku A. Pro zvýšení selekčního tlaku na růst bakteriálních izolátů jsem použil vyšší koncentraci diklofenaku, a to 2 g/l. Na obrázku 5 je fotografie Petriho misky s pevným LB médiem doplněném diklofenakem s narostlými monokoloniemi.



Obrázek 5 – detekce bakteriálních izolátů na pevném LB mediu doplněném diklofenakem v koncentraci 2 g/l. Ukázka Petriho misky s vysetou bakteriální kulturou vzorku B po 2. pasáži v ředění 10^{-5} (foto autor).

Výsledky ukázaly rozdíl v počtu životaschopných bakteriálních kolonií narostlých ve vzorcích A a B. Ze vzorku A (2. pasáž) jsem získal 10 monokloniových izolátů. Detekoval jsem nižší počet životaschopných buněk, a to 10^4 CFU/ml (zkratka CFU znamená colony-forming unit, tedy „kolonie tvořící jednotka“), ve srovnání se vzorkem B, ze kterého jsem získal celkem 50 monokloniových izolátů, což odpovídá 10^8 CFU/ml. Naproti tomu v kontrolních vzorcích bez diklofenaku jsem detekoval řádově více mikroorganismů, a to 10^9 CFU/ml ve vzorku A a 10^{13} CFU/ml ve vzorku B.

Jednotlivé monokloniové izoláty jsem přepikýroval (tj. přenesl sterilní kličkou) na misky s médii LB a BSB s diklofenakem (2 g/l) pro separaci kultur a jejich uchování ve větším množství. LB médium jsem použil kvůli větším nárůstům kolonií (obr. 6).



Obrázek 6 – Petriho miska s LB mediem doplněným diklofenakem v koncentraci 2g/l s bakteriálními izoláty získaná po pikýru monoklonií narostlých na BSB mediu v ředění 10^{-6} (foto autor)

3.3 Screening izolátů na utilizaci diklofenaku

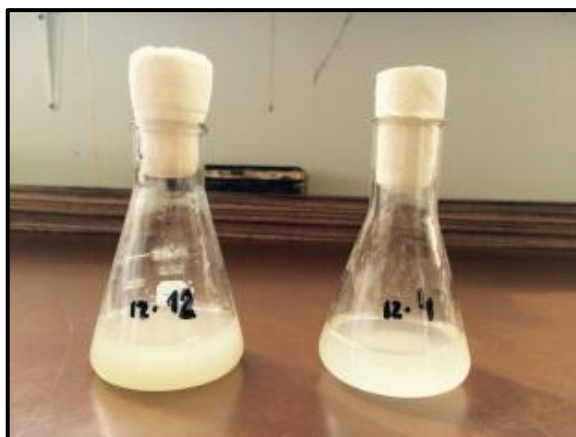
Pro funkční screening jsem použil 10 získaných bakteriálních izolátů ze vzorku A a 50 izolátů ze vzorku B. Screening probíhal v tekutém BSB médiu doplněném diklofenakem jako jediným zdrojem uhlíku v koncentraci 2 g/l, abych na bakterie působil silnějším selekčním tlakem. Všechny 60 jednotlivých izolátů z pevného LB média jsem přenesl sterilní kličkou do baněk s tekutým BSB médiem. Tyto vzorky jsem nechal kultivovat při teplotě 28 °C po dobu 120 hodin.

V průběhu kultivace jsem z baněk odebíral definované množství kultur a měřil jsem jejich koncentraci buněk pomocí optické hustoty (OD_{600}) na spektrofotometru při vlnové délce 600 nm v 1,5 ml plastových kyvetách. Měření jsem provedl pro každou kulturu třikrát a z naměřených hodnot jsem vypočítal aritmetický průměr. Výsledky ukázaly různé nárůsty biomasy u jednotlivých izolátů. Ze všech šedesáti izolátů pouze čtyři izoláty, označené jako 4, 12, 14 a 22, byly schopny růst v tekutém médiu doplněném diklofenakem jako jediném zdroji uhlíku. Výsledné hodnoty měření u vybraných pozitivních kultur jsou uvedeny v tabulce 2. U ostatních kultur se koncentrace buněk pohybovaly v rozmezí 0–0,2.

Tabulka 2 – stanovení koncentrace buněk u vybraných kultur po 48 a 120 hodinách kultivace (tabulka autor)

| Číslo vzorku | OD_{600} po 48 hodinách | OD_{600} po 120 hodinách |
|--------------|---------------------------|----------------------------|
| 4 | ±3,11 | ±2,70 |
| 12 | ±2,47 | ±2,39 |
| 14 | ±1,06 | ±1,16 |
| 22 | ±0,98 | ±1,11 |

Z těchto čtyř vybraných izolátů pouze izoláty č. 4 a 12 dosahovaly nejvyššího nárůstu buněk (OD_{600} 3,11 a 2,47) do 48 hodin kultivace. Po 120 hodinách kultivace již tyto kultury vykazovaly zastavení růstu.



Obrázek 7 – ukázka baněk, v nichž probíhal funkční screening izolátů 4 a 12 (foto autor)

3.4 Spektrofotometrické stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku

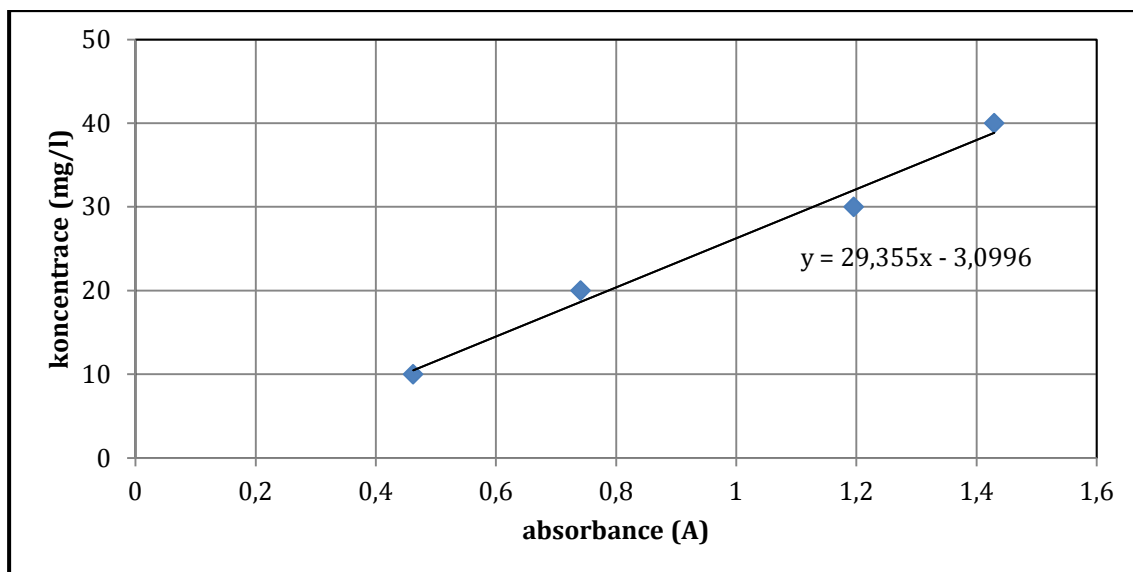
Stanovoval jsem zbytkovou koncentraci diklofenaku v médiích po nárůstu vybraných bakteriálních izolátů. Protože jsem znal výchozí koncentraci diklofenaku v médiu, používal jsem zároveň dvě metody, stanovení diklofenaku pomocí methylenové modři pro hodnoty koncentrace v řádu miligramů (měřil jsem při vlnové délce 638 nm) a stanovení pomocí octanu měďnatého pro koncentrace v řádu gramů (při vlnové délce 680 nm).

Zbytkovou koncentraci diklofenaku jsem stanovoval u pozitivních izolátů 4, 12, 14 a 22 po 120 hodinách kultivace. Z média s kulturou jsem odebral definované množství vzorku a po jeho centrifugaci jsem stanovoval zbytkovou koncentraci diklofenaku v supernatantu.

Koncentraci diklofenaku ve vzorku jsem poté vypočetl z rovnice předem připravené kalibrační křivky čistého diklofenaku. V tabulce 3 a grafu 1 jsou uvedeny hodnoty kalibrační křivky stanovení pomocí methylenové modři.

Tabulka 3 – stanovené hodnoty absorpance čistého diklofenaku měřené pomocí methylenové modři (tabulka autor)

| Měření | Koncentrace diklofenaku (mg/l) | Naměřená absorpance (A) |
|--------|--------------------------------|-------------------------|
| 1. | 10 | 0,4623 |
| 2. | 20 | 0,7412 |
| 3. | 30 | 1,1958 |
| 4. | 40 | 1,4297 |

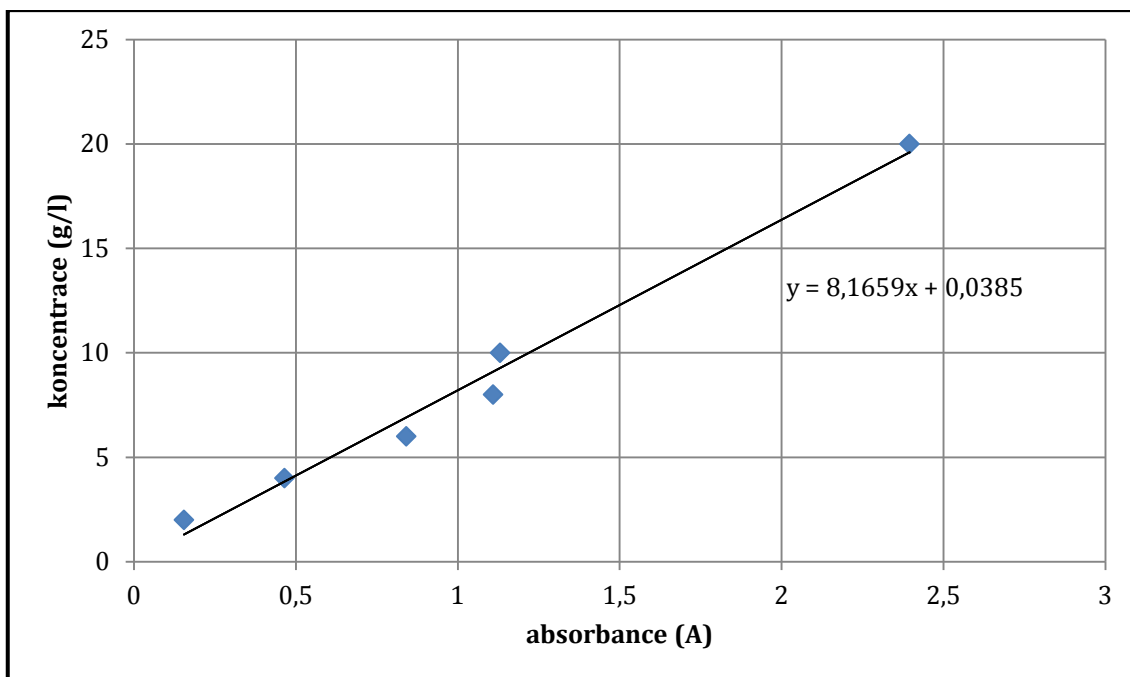


Graf 1 – kalibrační křivka stanovení koncentrace diklofenaku pomocí methylenové modři (graf autor)

V tabulce 4 a grafu 2 je vidět kalibrační křivka stanovení pomocí octanu měďnatého.

Tabulka 4 – hodnoty absorpance čistého diklofenaku stanovovaného pomocí octanu měďnatého (tabulka autor)

| Měření | Koncentrace diklofenaku (g/l) | Naměřená absorbance (A) |
|--------|-------------------------------|-------------------------|
| 1. | 2 | 0,1543 |
| 2. | 4 | 0,4647 |
| 3. | 6 | 0,8409 |
| 4. | 8 | 1,1091 |
| 5. | 10 | 1,1307 |
| 6. | 20 | 2,3951 |



Graf 2 – kalibrační křivka stanovení koncentrace diklofenaku pomocí octanu měďnatého (graf autor)

Rovnice kalibrační křivky stanovení roztokem methylenové modři, pomocí které jsem počítal zbytkovou koncentraci diklofenaku ve vzorku, je $y = 29,355x - 3,0996$. Rovnice kalibrační křivky stanovení pomocí octanu měďnatého je $y = 8,1659x + 0,0385$. Za x dosazují naměřenou absorbanci, y je výsledná koncentrace.

Výsledné vypočítané hodnoty zbytkových koncentrací diklofenaku v supernatantu izolátů 4, 12, 14 a 22 uvádím v tabulce 5.

Tabulka 5 – zbytkové koncentrace diklofenaku u vybraných izolátů (tabulka autor)

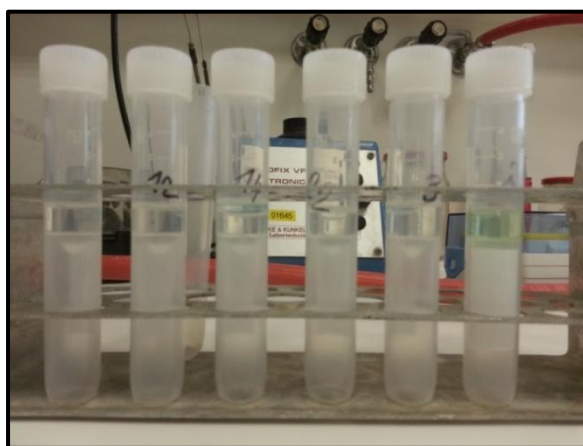
| izolát | zbytková koncentrace diklofenaku (mg/l) | úbytek diklofenaku oproti počáteční hodnotě (%) |
|--------|---|---|
| 4 | 48 | 97,6 |
| 12 | 74 | 96,3 |
| 14 | 650 | 67,5 |
| 22 | 280 | 86,0 |

Z výsledků v tabulce 5 vyplývá, že všechny čtyři izoláty degradují diklofenak, když je jediným přítomným zdrojem uhlíku. Největší množství diklofenaku degradovaly bakterie z izolátů č. 4 a 12. U těchto izolátů byla degradace téměř stoprocentní.

Nejpomaleji degradoval izolát č. 14, nicméně i ten spotřeboval za 120 hodin kultivace více než dvě třetiny diklofenaku v médiu.

Z tabulky 5 rovněž vyplývá, že pro stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku je vhodnější metoda stanovení pomocí methylenové modři, protože pomocí ní jsem schopený detekovat diklofenak již v koncentracích v řádech miligramů (detekční limit je 0,4 mg/l (12)) a všechny naměřené koncentrace jsou nižší než 1 g/l. Metoda využívající octan měďnatý je vhodnější při stanovování vyšších koncentrací, neboť její detekční limit je 0,8 g/l (12), a kdybych tedy používal jen stanovení pomocí octanu měďnatého, nebyl bych schopený zbytkovou koncentraci stanovit.

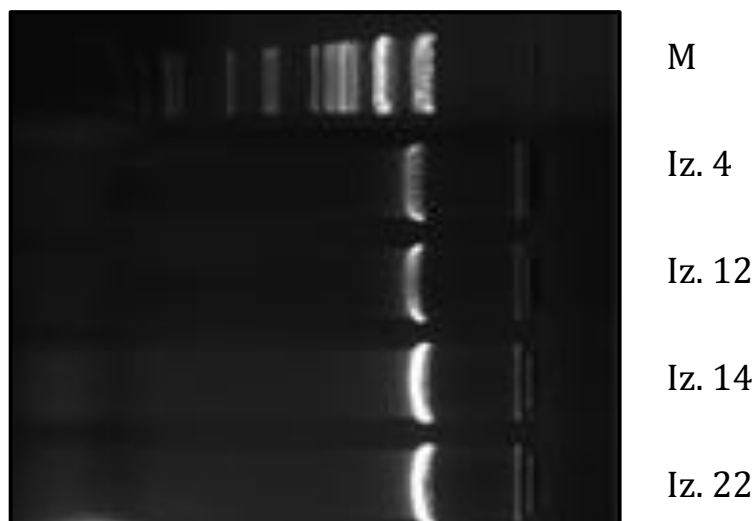
Na obrázku 8 je ukázka zkumavek se supernatanty připravenými ke stanovení pomocí octanu měďnatého. Mezi vzorky extrahovaných supernatantů a vzorkem s čistým diklofenakem v koncentraci 2 g/l v poslední zkumavce je patrný barevný rozdíl, který lze pozorovat i pouhým okem. Vzorek s diklofenakem byl použit pro kontrolu měření.



Obrázek 8 – vzorky připravené k stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku pomocí octanu měďnatého (foto autor)

3.5 Taxonomické určení pozitivních izolátů

Všechny pozitivní izoláty 4, 12, 14 a 22 jsem taxonomicky zařadil do bakteriálního kmene pomocí fylogenetické analýzy jejich genu kódujícího 16S rRNA. Jejich chromozomální DNA jsem pro kontrolu detekoval na elektroforéze (obr. 9). Poté jsem pomocí standardní metody PCR namnožil úsek jejich 16S rDNA, kterou jsem následně odeslal k sekvenaci do střediska sekvenování DNA, Mikrobiologický ústav AV ČR. Obdrženou sekvenci nukleotidů jsem následně porovnal s internetovou databází GenBank, přičemž jsem použil program BLASTN 2.2.26.

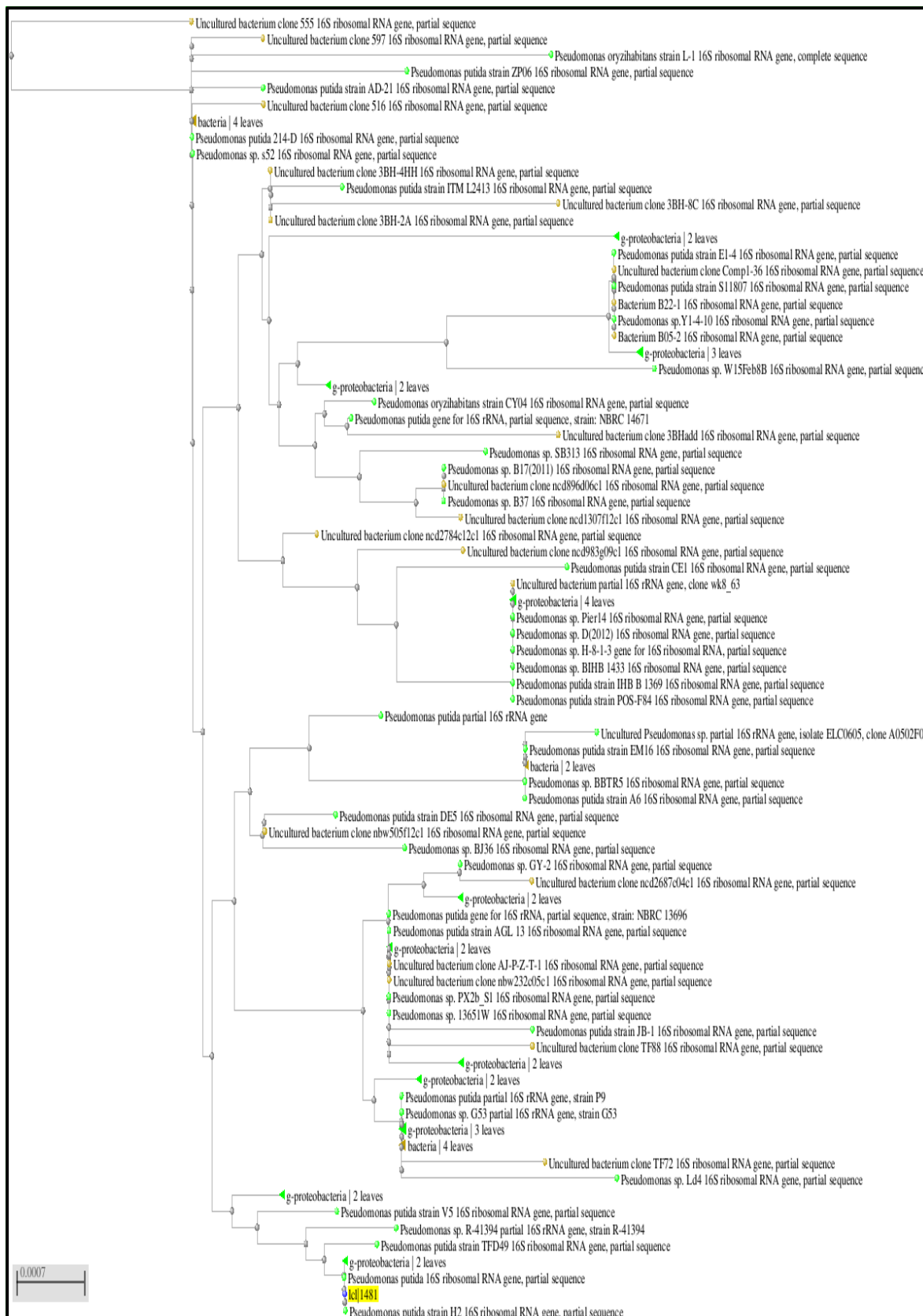


Obrázek 9 – fotografie purifikované DNA v agarózovém gelu. Vpravo od obrázku je legenda, M je marker. (foto autor)

Izoláty 4 a 12 jsem touto metodou zařadil do bakteriálního kmene *Pseudomonas putida*. Úsek 16S rDNA mých izolátů se s tímtež úsekem kmene *Ps. putida* v databázi shodoval ve více než 95 % nukleotidů.

Izoláty 14 a 22 jsem nezařadil do konkrétního kmene, nicméně pravděpodobně patří do skupiny *Pseudomonas*. V databázi byly oběma izolátů nejbližší kmeny *Ps. putida* (shoda v 60 % nukleotidů) a *Ps. fluorescens* (shoda 55 % nukleotidů).

Na obrázku 10 je část fylogenetického stromu vytvořeného použitým programem. *Pseudomonas putida*, do níž jsem zařadil izoláty 4 a 12, je v dolní části obrázku zvýrazněna žlutou barvou.



Obrázek 10 – fylogenetická analýza pozitivních izolátů. Nalezená *Pseudomonas putida* degradující diklofenak je označena žlutě. (obrázek autor)

4 Diskuse

O diklofenaku je známo, že se nachází v relativně vysokých koncentracích v životním prostředí, nejčastěji v odpadních a povrchových vodách a v půdě. Diklofenak je obtížně degradovatelná látka, je toxický pro většinu organismů v životním prostředí a kumuluje se v potravních řetězcích. Tato fakta popisuje studie provedená Céline Tixier a spol. (14), která dokládá přítomnost diklofenaku v povrchových vodách a jako nejvýznamnější způsob jeho degradace uvádí fotolýzu. Též uvádějí, že ve vodě opouštějící čističku odpadních vod naměřili koncentraci diklofenaku 0,99 µg/l, což znamená, že běžné procesy v čističkách odpadních vod nedokážou diklofenak úplně odstranit.

V České republice byla provedena studie, která potvrdila přítomnost diklofenaku v pitné vodě pouze výjimečně a nikdy v koncentraci, která by byla nebezpečná pro člověka. (6)

V roce 2013 byl diklofenak přidán na watchlist evropské unie, což znamená, že by členské státy EU měly průběžně sledovat koncentrace diklofenaku ve svých povrchových vodách a věnovat mu jakožto polutantu náležitou pozornost. (8; 15)

Podle studie, kterou provedl J. Lindsay Oaks a spol., je přítomnost diklofenaku a jeho metabolitů v prostředí přímou příčinou velkého úbytku populace supa bengálského (*Gyps bengalensis*) v Indii a okolí. V této oblasti vyhynulo přibližně od roku 1990 přes 90–95 % populace tohoto supa, který je zde vrcholovým predátorem, nicméně zřejmě nemá enzym, kterým by dokázal diklofenak rozložit, a ten se tak kumuluje v jeho organismu. V průběhu studie byl experimentální populaci supů diklofenak podáván přímo a rovněž v podobě diklofenakem živených hospodářských zvířat. Tito supi hynuli v důsledku selhávání funkce ledvin, stejně jako supi žijící běžně v prostředí kontaminovaném diklofenakem. (16)

Hlavním cílem mé práce je izolace bakteriálního kmene, který využívá diklofenak a současně je schopný ho využít jako zdroj energie v prostředí, kde nemá žádný jiný zdroj k dispozici. Takové bakteriální izoláty jsem našel a zařadil do kmene *Pseudomonas putida*. Nalezené izoláty diklofenak využívají jako zdroj energie po dobu pěti dnů, což naznačuje, že mikroorganismy využívají i metabolity diklofenaku a probíhá jeho plná degradace, možná až na úroveň mineralizace.

Izolace této bakterie a její identifikace je důležitá pro navazující výzkumné práce v Akademii věd, kde bude například popisována a ověřována metabolická dráha degradovaného diklofenaku a izolace enzymů, které se jí účastní. V případě, že nastane potřeba izolovat další bakterie degradující diklofenak, bude rovněž možné využít metodiku z této práce.

Ve své práci jsem pracoval se dvěma medii. Medium LB patří mezi tzv. komplexní media, protože obsahuje vše, co běžně bakterie potřebují k životu, tedy zdroj uhlíku, energie, dusíku, stopové prvky, aminokyseliny atd. Toto medium jsem používal, když jsem chtěl, aby bakteriální kolonie narostly rychleji a do větší hustoty biomasy.

Druhé použité medium, BSB, je tzv. minimální, obsahuje pouze základní soli, zdroj dusíku a stopové prvky, které by bakterie mohly potřebovat pro svůj metabolismus. Toto medium jsem využil, jestliže jsem chtěl dokázat, že daný bakteriální izolat dokáže jako zdroj uhlíku využít diklofenak, neboť toto medium žádný zdroj uhlíku neobsahuje.

Zjistil jsem, že z kontrolních vzorků půd jsem po kultivaci bez diklofenaku detekoval řádově více životaschopných buněk než při kultivaci s diklofenakem. Detekoval jsem ve vzorku A bez diklofenaku 10^9 CFU/ml a v přítomnosti diklofenaku pouze 10^4 CFU/ml. Ve vzorku B jsem za shodných podmínek detekoval 10^{13} a 10^{10} CFU/ml. Z toho plyne, že přítomnost diklofenaku v mediu zabrání naprosté většině mikroorganismů v růstu. Dále je patrné, že více mikroorganismů lze detekovat v kontaminované půdě odebrané z větší hloubky, což je patrně způsobeno tím, že dešťová voda v místě odběru vzorků splachuje ze svrchní vrstvy půdy část mikroorganismů.

Koncentrace diklofenaku v použitých mediích byla rovna 1–2 g/l. Koncentrace 2 g/l působí na mikroorganismy větším selekčním tlakem. Zároveň mikroorganismy, které jsou schopné diklofenak využít, mají k dispozici větší množství tohoto zdroje.

Z mých výsledků je dále patrné, že na agarových miskách s diklofenakem vyrostlo celkem 60 monoklonií, ale v tekutých médiích byly z těchto 60 životaschopné pouze čtyři. Tento rozdíl je zřejmě způsoben tím, že na miskách narostly kolonie bakterií, které byly schopné přežít v prostředí s diklofenakem, který je pro běžné mikroorganismy toxický, nicméně nebyly nuceny ho využít jako výhradní zdroj uhlíku, neboť rostly na agaru, ve kterém je lepší dostupnost živin. Ve skleněných baňkách s tekutým minimálním mediem tento zdroj není, a proto přežily pouze ty kmeny, které skutečně jsou schopny diklofenak jako zdroj energie využít.

Výsledkem mé práce je nalezení kmene *Pseudomonas putida* (dále jen *Ps. putida*) využívající diklofenak, což se shoduje s literaturou, která uvádí, že kmen *Ps. putida* je schopen biodegradace diklofenaku za oxidace Mn^{2+} na Mn^{4+} za působení enzymu monooxygenázu. (10; 3)

V oboru mikrobiologie nevzniklo mnoho odborných prací, které by se zabývaly přímo biodegradací diklofenaku konkrétními mikroorganismy. Některé práce, na-

příklad Gröning a spol. (17) popisují degradaci diklofenaku ve vodním prostředí. V této práci autoři mimojiné uvádějí, že degradace diklofenaku mikroorganismy má nejspíše kometabolický charakter. Mé výsledky však ukazují na mikroorganismus s metabolickou drahou degradující diklofenak jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Tina Kosjek a spol. v závěru svého článku o metabolismu diklofenaku v aktivovaném kalu (18) uvádí, že v čističkách odpadních vod je nejdůležitějším degradačním procesem utilizace mikroorganismy, ve vodním prostředí pak převažuje fotolýza diklofenaku, přičemž ale nedochází k jeho úplné mineralizaci.

Výsledky mé práce potvrdily skutečnost, že na odstranění diklofenaku z odpadních vod se podílejí velkou mírou mikrobiální biodegradační procesy, což je uvedeno v literatuře Vieno a spol. (8), kteří uvádějí, že na odstranění diklofenaku z odpadní vody se v čističkách odpadních vod podílejí více mikrobiální biodegradační procesy než sorpce na aktivovaný kal.

Biodegradační potenciál bakterie *Ps. putida* popisuje Merburg a spol. (10), kteří ve své práci o degradaci diklofenaku přímo uvádějí, že bakterie *Ps. putida* dokáže diklofenak degradovat, což jsem potvrdil.

Mé výsledky rovněž souhlasí s prací Kotturi a spol. (19), která uvádí, že bakterie z kmene *Ps. putida* dokážou jako zdroj uhlíku a energie využít fenol. Molekula diklofenaku obsahuje dvě benzenová jádra, a v tomto ohledu je fenolu strukturně podobná.

Přínosem mé práce je potvrzení mikrobiální degradace aktivních farmaceutických látek a nalezení kmene *Ps. putida* disponující metabolickou drahou vedoucí k degradaci farmaceutické látky nebo k tvorbě netoxických produktů.

5 Závěr

Ze vzorku kontaminované půdy odebrané z hloubky 10 cm jsem získal 10 monoklonií, ze vzorku odebraného z hloubky 30 cm jsem získal 50 monoklonií. Těchto 60 izolátů tedy dokáže narůst v přítomnosti diklofenaku.

V tekutém minimálním médiu doplněném diklofenakem však z těchto 60 izolátů dokázaly narůst pouze čtyři. Ty v průběhu 120 hodin kultivace spotřebovaly od 68 do 98 % diklofenaku v médiu. Tyto kmeny tedy mohou využívat diklofenak jako zdroj uhlíku a energie.

Dva z těchto izolátů jsem pomocí fylogenetické analýzy jejich 16S rRNA identifikoval a zařadil do kmene *Pseudomonas putida*.

Jako vhodnější metoda stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku v médiu se ukázala metoda využívající methylenovou modř, protože má nižší detekční limit.

6 Seznam literatury

1. **Loonen, H., a další.** *Prediction of biodegradability from chemical structure: modeling of ready biodegradation test data.* Malden : Environmental Toxicology and Chemistry, 1999. stránky 1763-1768. ISSN: 0730-7268.
2. **Uhlík, Ondřej, a další.** Identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem – od kultivace k metagenomice. *Chem. listy 107.* 2013, stránky 614-622.
3. **Stiborová, Marie, a další.** Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. listy 98.* 2004, stránky 876-890.
4. **Kotýza, Jan, a další.** Léčiva – "Nový" environmentální polutant. *Chemické listy 107.* 2009, stránky 540 - 547.
5. Zákon č. 378/2007 Sb., § 2, o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů.
6. **Čadek, Václav, Jeligová, Hana a Kožíšek, František.** *Výskyt humánních léčiv v pitných vodách v České republice.* [dokument pdf] Praha : Státní zdravotní ústav, 2011.
7. **Matějů, Vít, a další.** *Ekotoxikita antibiotik a hormonů.* [dokument pdf] Praha : ENVISAN-GEM, a. s., 2012. ISSN 1335-0285.
8. **Vienno, Niina a Sillanpää, Mika.** *Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – A review.* místo neznámé : Environment international, 2014. stránky 29-39.
9. **Triebkorn, R., a další.** Toxic effects of non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac, Part 2. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology.* 2004, 68, stránky 151-166.
10. **Meerburg, F., a další.** *Diclofenac and 2-anilinophenylacetate degradation by combined activity of biogenetic manganese oxides and silver.* místo neznámé : Microbiologic biotechnology, 2012. ISSN: 1751-7907.
11. **Weisburg, W. G., a další.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology.* 1991, 173, stránky 697-703.
12. **Čapka, Lukáš, a další.** Využití UV/VIS spektrofotometrie pro stanovní diklofenaku. *Chemické listy 107.* 2013, stránky 550-554.
13. **www.roche-applied-science.com.** High Pure PCR Template Preparation Kit. místo neznámé : www.roche-applied-science.com. Version 20.

14. **Tixier, Céline, a další.** Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environmental Science Technology*. 6. Únor 2003, stránky 1061–1068.
15. **Chatain, Babtiste.** Surface waters: 12 new controlled chemicals, three pharmaceuticals on watch list. *European Parliament News*. [Online] 7. Únor 2013. [Citace: 23. Leden 2016.] <http://www.europarl.europa.eu/news/en/news-room/20130701IPR14760/Surface-waters-12-new-controlled-chemicals-three-pharmaceuticals-on-watch-list>.
16. **Oaks, J. Lindsey, a další.** Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*. 12. Únor 2004.
17. **Groning, Janosch, a další.** Transformation of diclofenac by indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*. 2007, stránky 509-516.
18. **Kosjek, Tina, a další.** Metabolism studies of diclofenac and clofibric acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole - time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hydrology*. 2009, stránky 109-117.
19. **Kotturi, Gopaul, Robinson, Campbell W. a Inniss, William B.** Phenol degradation by a psychrotrophic strain of *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Leden 1991, 34, stránky 539-543.

7 Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 – tok léčiv nebo jejich metabolitů do životního prostředí (4)..... | 10 |
| Obrázek 2 – strukturní vzorec diklofenaku (10) | 12 |
| Obrázek 3 – oxidace Mn^{2+} a degradace diklofenaku jako spřažená reakce. (10) | 13 |
| Obrázek 4 – vzorky kontaminované půdy A a B v BSB mediu doplněném diklofenakem, po 1. pasáži (foto autor)..... | 22 |
| Obrázek 5 – detekce bakteriálních izolátů na pevném LB mediu doplněném diklofenakem v koncentraci 2 g/l. Ukázka Petriho misky s vysetou bakteriální kulturou vzorku B po 2. pasáži v ředění 10^{-5} (foto autor)..... | 23 |
| Obrázek 6 – Petriho miska s LB mediem doplněným diklofenakem v koncentraci 2g/l s bakteriálními izoláty získaná po pikýru monoklonií narostlých na BSB mediu v ředění 10^{-6} (foto autor) | 23 |
| Obrázek 7 – ukázka baněk, v nichž probíhal funkční screening izolátů 4 a 12 (foto autor) | 25 |
| Obrázek 8 – vzorky připravené k stanovení zbytkové koncentrace diklofenaku pomocí octanu měďnatého (foto autor)..... | 28 |
| Obrázek 9 – fotografie purifikované DNA v agarózovém gelu. Vpravo od obrázku je legenda, M je marker. (foto autor)..... | 29 |
| Obrázek 10 – fylogenetická analýza pozitivních izolátů. Nalezená <i>Pseudomonas putida</i> degradující diklofenak je označena žlutě. (obrázek autor)..... | 30 |

8 Seznam grafů

| | |
|--|----|
| Graf 1 – kalibrační křivka stanovení koncentrace diklofenaku pomocí methylenové modři (graf autor) | 26 |
| Graf 2 – kalibrační křivka stanovení koncentrace diklofenaku pomocí octanu měďnatého (graf autor) | 27 |

9 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 – program kroků pro PCR (tabulka autor) | 20 |
| Tabulka 2 – stanovení koncentrace buněk u vybraných kultur po 48 a 120 hodinách kultivace (tabulka autor)..... | 24 |
| Tabulka 3 – stanovené hodnoty absorbance čistého diklofenaku měřené pomocí methylenové modři (tabulka autor) | 25 |
| Tabulka 4 – hodnoty absorbance čistého diklofenaku stanovovaného pomocí octanu měďnatého (tabulka autor) | 26 |
| Tabulka 5 – zbytkové koncentrace diklofenaku u vybraných izolátů (tabulka autor) | 27 |