



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Bi6420

Ekotoxikologie mikroorganismů

<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2014/Bi6420/index.qwarp>

Doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

hofman@recetox.muni.cz

jaro 2014



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu byla spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Bi6420: Ekotoxikologie mikroorganismů

Část 1: Úvod

O čem je ekotoxikologie
Mikroorganismy (připomenutí)
Mikroorganismy v ŽP
Ekotoxikologie MO jako obor



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu byla spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

O čem je ekotoxikologie

O čem je ekotoxikologie?

- Věda studující toxické efekty a efekty chemického (i ostatního stresu) v přírodě, u přírodních organismů (EKO...), zejména efekty v populacích a společenstvech (EKO...), někdy zahrnuje i efekty na člověka (!)
- Interdisciplinární vědní obor kombinující poznatky věd studujících ekosystémy (EKologie) a vědy studující interakce chemických látek s organismy (toxikologie)

Hlavní cíle ekotoxikologie

- poznání interakcí mezi živými organismy a chemickými/toxickými látkami v prostředí na všech úrovních
- využití poznatků pro racionální ochranu živých organismů, jejich populací, společenstev a ekosystémů před chemickým znečištěním
- prakticky: odpovídat na otázky, jaká expozice vyvolá jaký efekt ? → **hodnocení ekologických rizik (PEC/PNEC)**
- vědecky: proč takový efekt, jaké jsou okolnosti, důsledky ...

Ekotoxikologie vs Ekologie ?

Ekologie	Ekotoxikologie
Velmi široký záběr (vztahy mezi organismy navzájem a organismy a prostředím)	Zúžený zájem – organismy vs. prostředí, resp. negativní vlivy změn prostředí (vyvolané člověkem)
Studuje spíše "fyziologické" (přirozené) stavy - vlivy běžných faktorů prostředí – teplota, vlhkost, světlo	Studuje nefyziologické stavy – nepřirozené látky v prostředí, nadměrné působení fyzikálních stresorů (hluk, záření, stavby ...)
Ekologie vychází z polních (ekologických) studií	Více informací o jednotlivých druzích, polní studie jen v omezeném množství, často nejednoznačné výsledky



Co jsou to toxikanty?

- látky které jsou toxické v relativně nízkých koncentracích a nejsou přírodního původu (většinou..., viz např. cyanotoxiny)
- z chemického pohledu látky z širokého spektra chemických látek (ropné produkty, organické látky, těžké kovy, farmaceutika, pesticidy, detergenty ...), které mohou být uvolňovány do prostředí a mohou mít v ekosystémech specifické efekty/interakce
- Každá lidská činnost vnáší do prostředí (toxické) látky
 - produkty a vedlejší produkty průmyslu
 - domácí odpad (detergenty, plasty)
 - produkty užívané v zemědělství
 - odpady z dopravy
 - veterinární a humánní farmaceutika
 - ...



Jaké biologické systémy ekotoxikologie zkoumá?

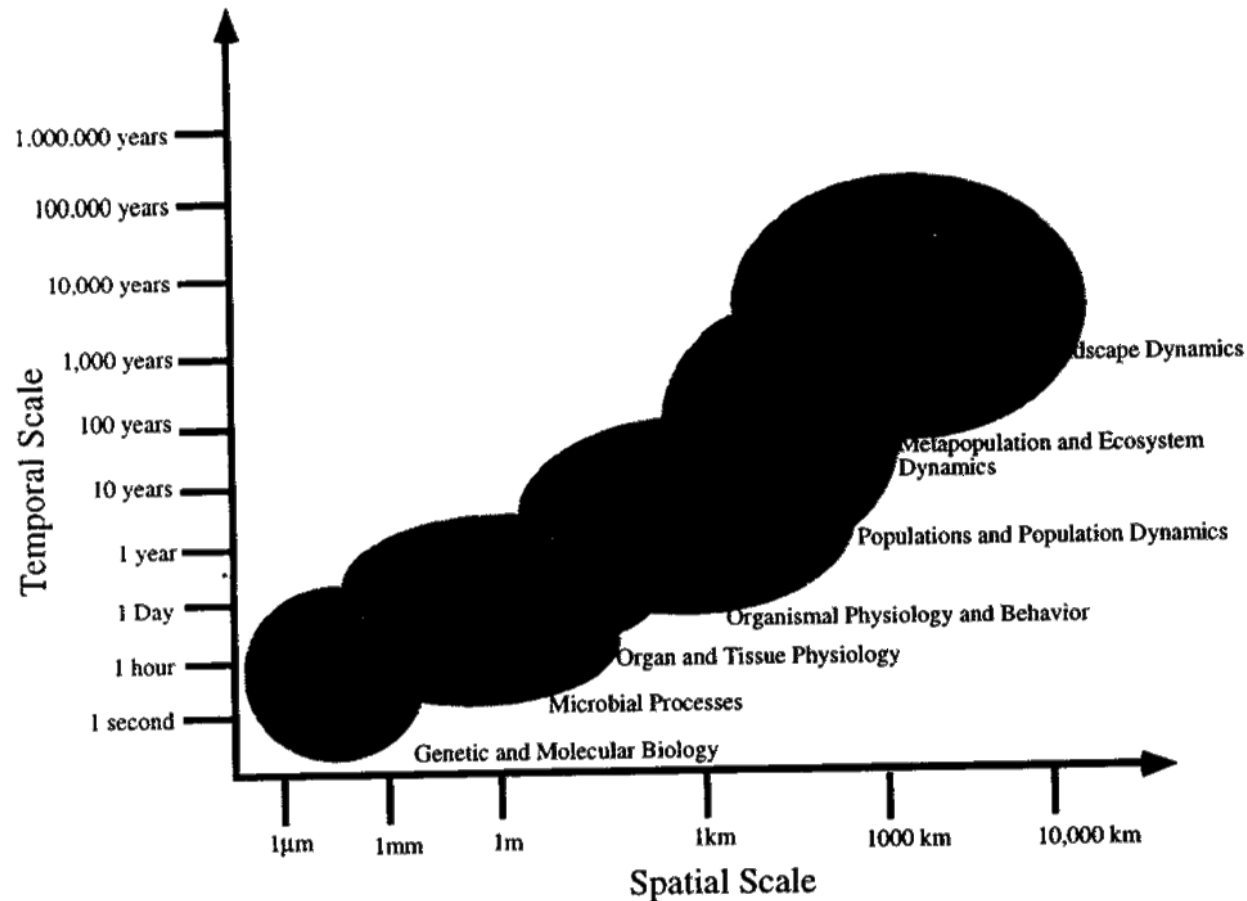
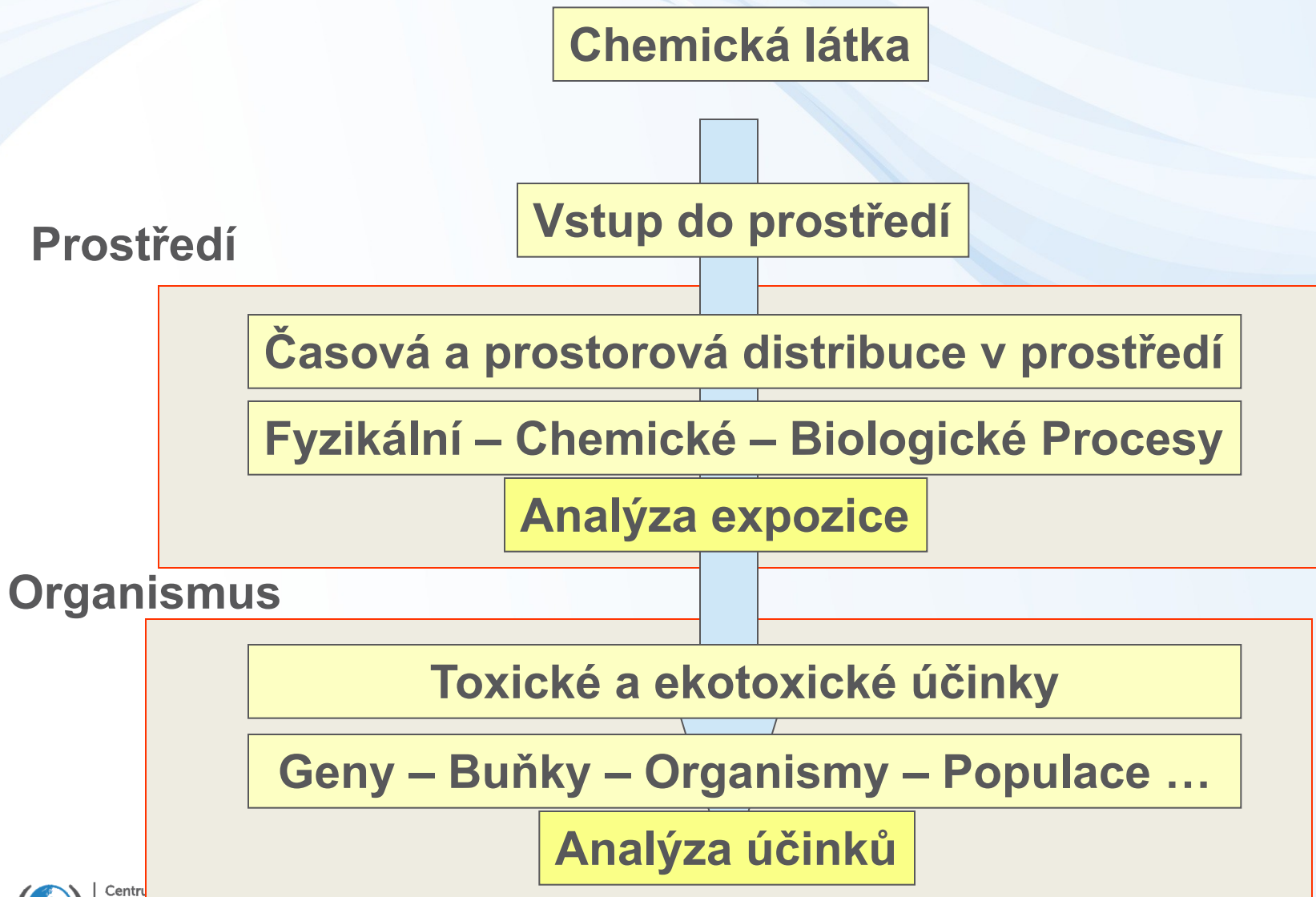


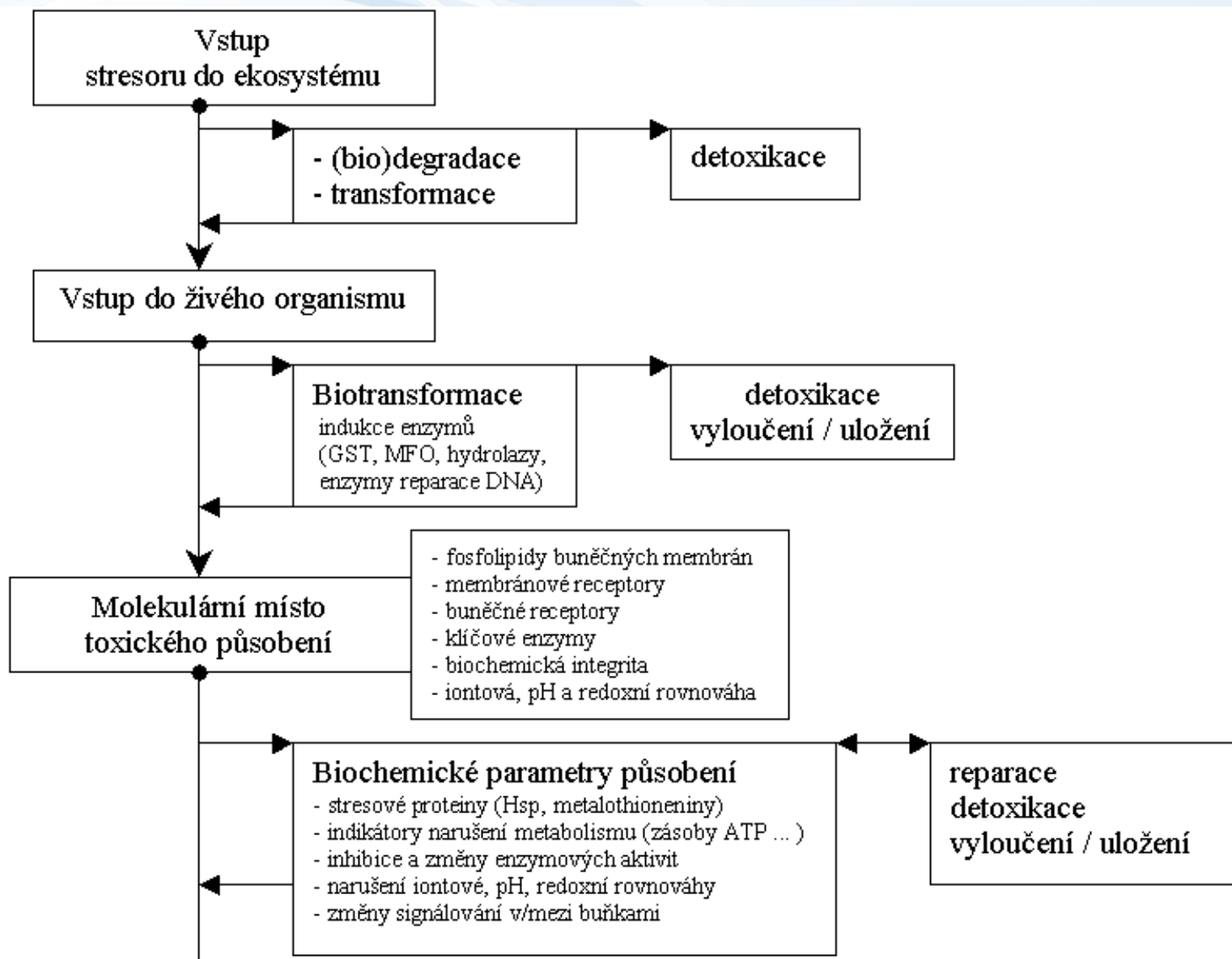
Figure 2.3 The overlap of spatial and temporal scales in environmental toxicology. Not only are there scales in organization, but scales over space and time exist. Many molecular activities exist over short periods and volumes. Populations can exist over relatively small areas, even a few square meters for microorganisms, and thousands of square kilometers for many bird and mammal populations. Although often diagrammed as discrete, each of these levels are intimately connected and phase one into another along both the space and time scales.



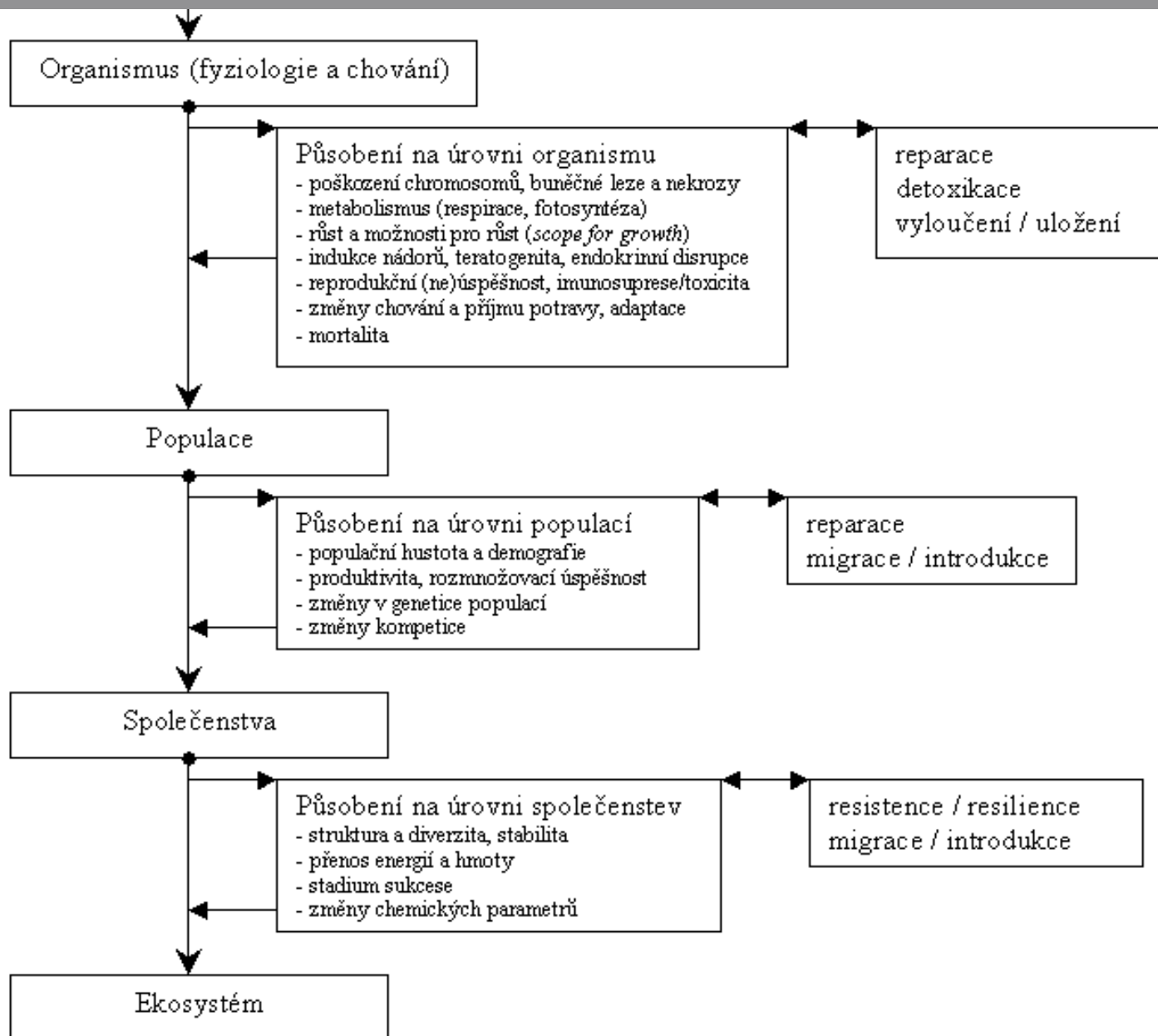
Koncepce ekotoxikologie – „ekotoxikologický děj“



Interakce toxické látky a živého organismu



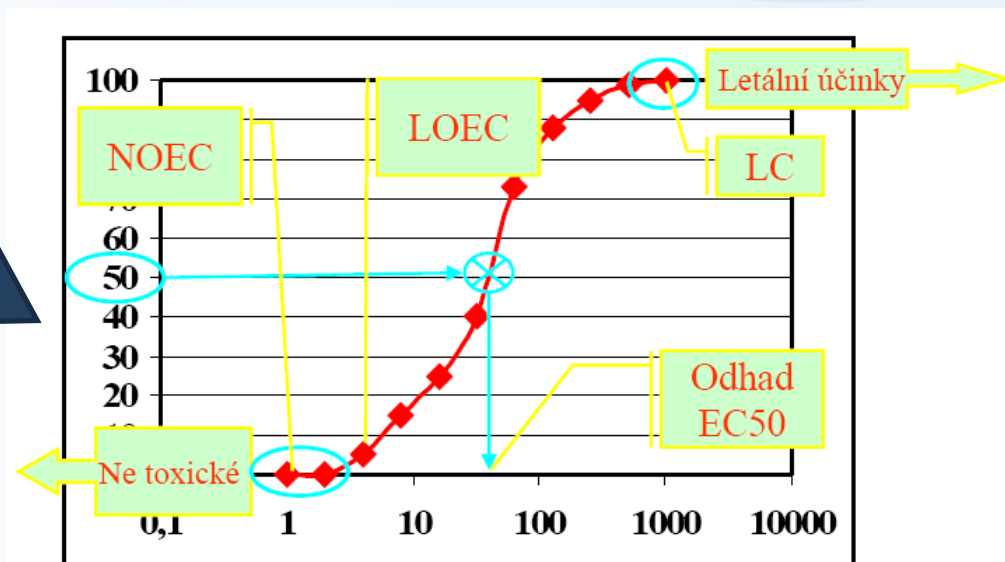
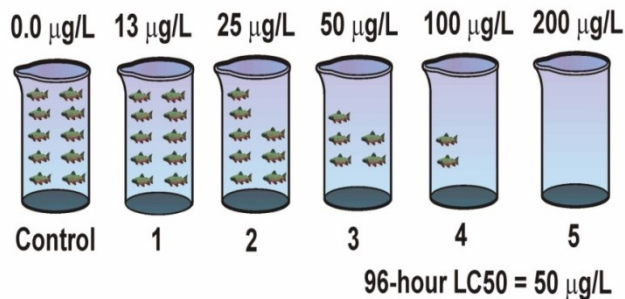
Interakce toxické látky a živého organismu



Přístupy ekotoxikologie

- **Prospektivní přístup:** laboratorní studie efektů „nových“ chemikálií a směsí, studie v simulovaných mikro/mezo ekosystémech, předpovědi efektů v ekosystémech ...
- Klasické zjištění koncentrace, která vyvolává efekt – testy toxicity
- **výsledek NOEC, LOEC, EC10, EC50, LC50 → PNEC**

Concentration:

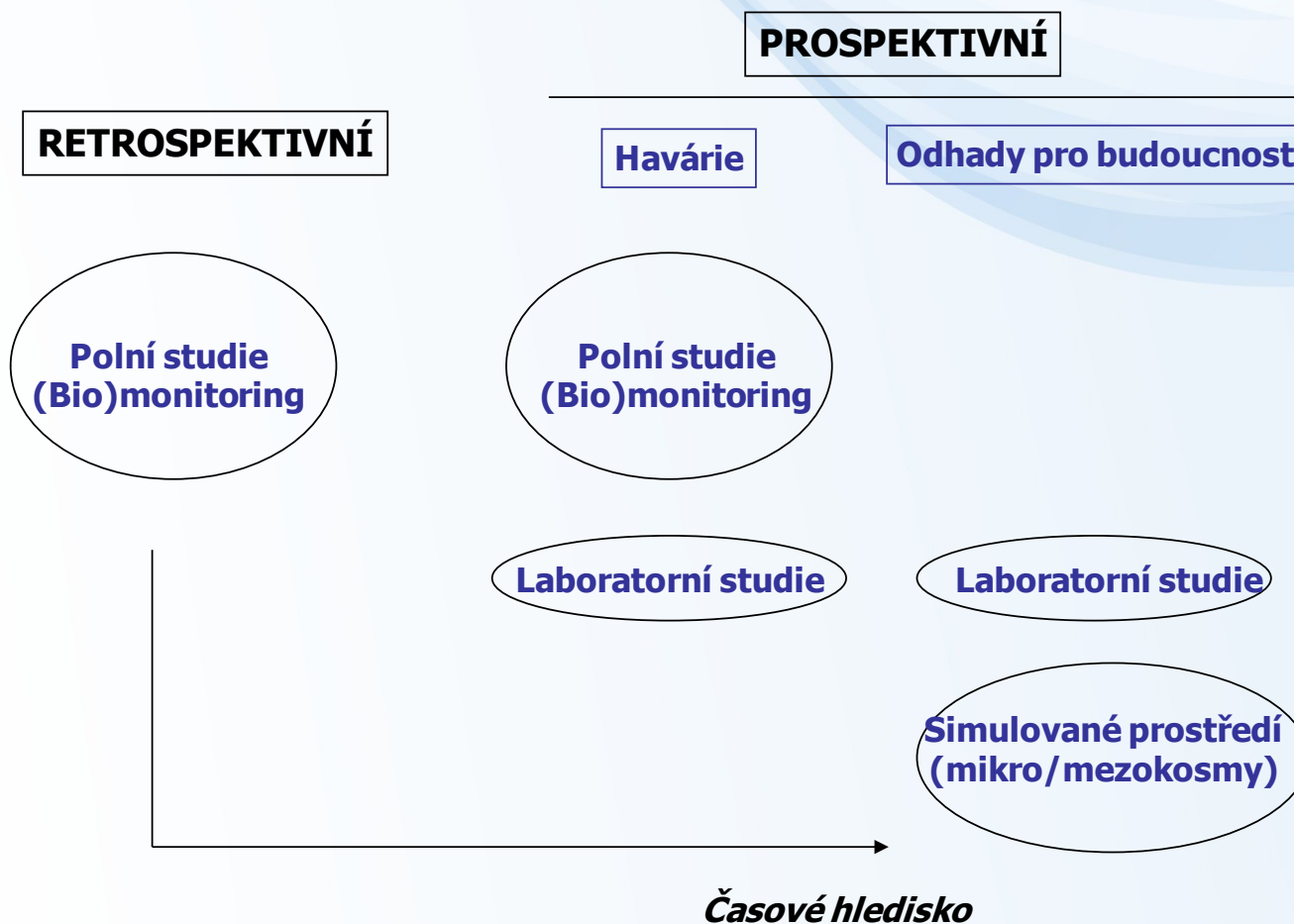


Logaritmické měřítko
Křivka – sigmoidní tvar

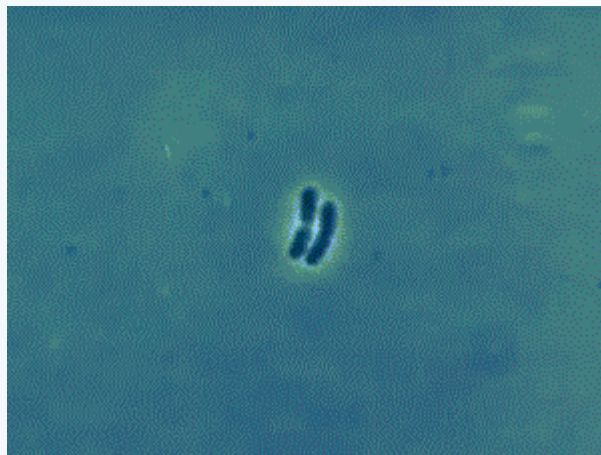


Přístupy ekotoxikologie

- **Retrospektivní přístup:** studie reálných ekosystémů, studie poškození v minulosti, odhady pro budoucnost, srovnání poškozený/zdravý ...



Mikroorganismy (připomenutí)



Kolik je v prostředí mikroorganismů?

- Biodiverzita mikroorganismů je mnohem větší než jsme se původně domnívali
- Venter et al. 2004, Science:
 - DNA z Sargasového moře – 1,2 mil nových genů a evidence 148 nových druhů
- Tyto objevy pokračují smělymi plány na genetickou „inventuru“ celé planety
- GENOMICS: měří úplný genetický kód organismu pomocí vysokoúčinného sekvenování párů bazí jeho DNA (např. člověk 3×10^9 bp)
- METAGENOMICS: měří kód pro celé společenstvo určitého prostředí (např. u půdy se v 1 g odhaduje 10^{12} bp!! x moře cca 6×10^9 bp)



Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea

J. Craig Venter,^{1*} Karin Remington,¹ John F. Heidelberg,²
Aaron L. Halpern,² Doug Rusch,² Jonathan A. Eisen,³
Dongying Wu,³ Ian Paulsen,³ Karen E. Nelson,³ William Nelson,³
Derrick E. Fouts,³ Samuel Levy,² Anthony H. Knap,⁶
Michael W. Lomas,⁶ Ken Nealson,⁵ Owen White,³
Jeremy Peterson,³ Jeff Hoffman,¹ Rachel Parsons,⁶
Holly Baden-Tillson,¹ Cynthia Pfannkoch,¹ Yu-Hui Rogers,⁴
Hamilton O. Smith¹

Kolik je v prostředí mikroorganismů?



252 | APRIL 2009 | VOLUME 7

EDITORIAL

TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome

Vogel and colleagues invite the microbiology community to participate in an ambitious and extraordinary sequencing project to uncover the soil metagenome.

<http://www.terragenome.org>



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Kolik je v prostředí mikroorganismů?

Metagenomics

NATURE | Vol 455 | 25 September 2008

Philip Hugenholtz and Gene W. Tyson

Ten years after the term metagenomics was coined, the approach continues to gather momentum. This culture-independent, molecular way of analysing environmental samples of cohabiting microbial populations has opened up fresh perspectives on microbiology.



The 454 Life Sciences GS FLX sequencing system is used in many metagenomics projects.

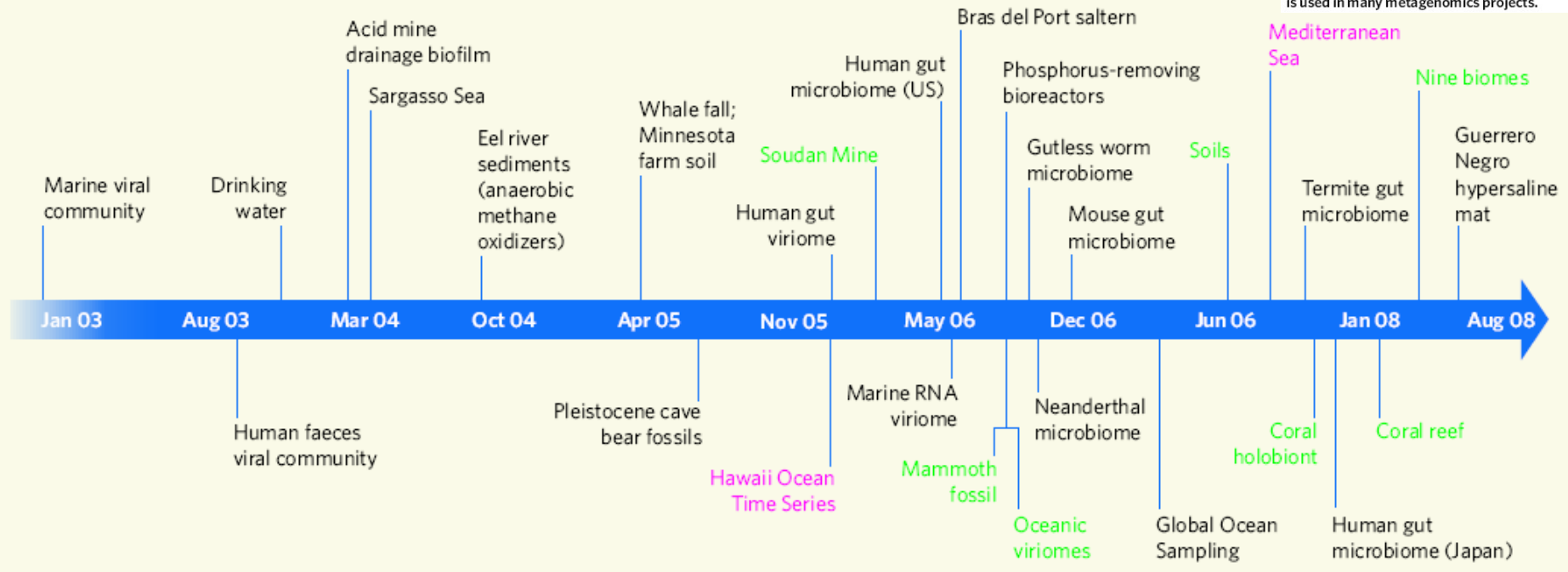


Figure 1 | Timeline of sequence-based metagenomic projects showing the variety of environments sampled since 2002. The oceanic viromes (all viruses in a habitat) (August 2006) were from the Sargasso Sea, Gulf of Mexico, coastal British Columbia and the Arctic Ocean. The nine biomes (March 2008) were stromatolites, fish gut, fish ponds, mosquito virome, human-lung virome, chicken gut, bovine gut and marine virome. The different technologies used are dye-terminator shotgun sequencing (black), fosmid library sequencing (pink) and pyrosequencing (green). (Graphic based on data sets represented at www.genomesonline.org.)

Kolik je v prostředí mikroorganismů?

DISCOVERY IN THE DIRT

Soil microbes are notoriously hard to culture, so how can we make the ground yield its secrets? **Virginia Gewin** finds that genetic sequencing — of samples not species — may be the answer.

Metagenom půdy

- Leonardo da Vinci: „O nebesích víme více než o půdě pod našima nohama“
- Do nedávna byli vědci odkázáni pouze na izolační a kultivační techniky a o mikrobiálním světě vody, půdy a sedimentů se dovídali jen cca 0,1 - 1 % informace
- S rozvojem molekulární biologie lze tento „skrytý vesmír“ poznat celý – nicméně ne jako „druhy“ ale jako celek – genom, metagenom
- obrovský potenciál např. objevy nových léčiv, degradátorů polutantů, biotechnologie ...

NATURE|Vol 439|26 January 2006

“Once the diversity of the microbial world is catalogued, it will make astronomy look like a pitiful science.”
— Julian Davies

“The soil work is like trying to assemble 40,000 human genomes simultaneously.”
— Craig Venter

Kolik je v prostředí mikroorganismů?

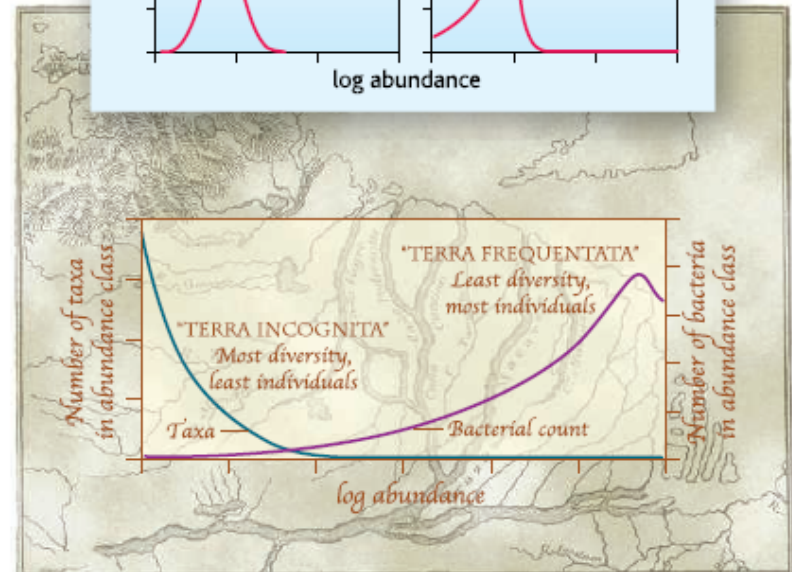
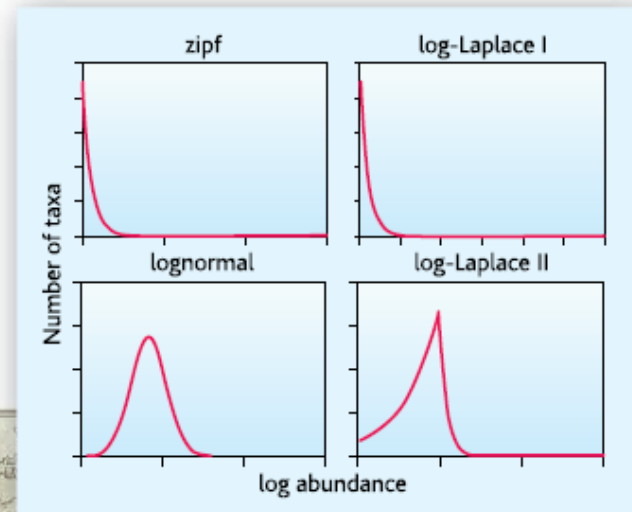
Exploring Microbial Diversity— A Vast Below

T. P. Curtis and W. T. Sloan

26 AUGUST 2005 VOL 309 SCIENCE www.sciencemag.org

genomic diversity. However, the authors have gone further and show that there is probably enough data in published DNA reassociation curves for bacterial communities to allow discrimination between different possible species abundance curves. By applying new mathematical treatment of data, the authors generate abundance curves, the most plausible of which suggests that there could be 10^7 distinct prokaryote taxa in 10 grams of pristine (free of chemical contaminants) soil (see the figure).

Moreover, rare organisms comprise most of this diversity. They further determine that most of these rare organisms could be wiped out by heavy metal pollution of the soil.

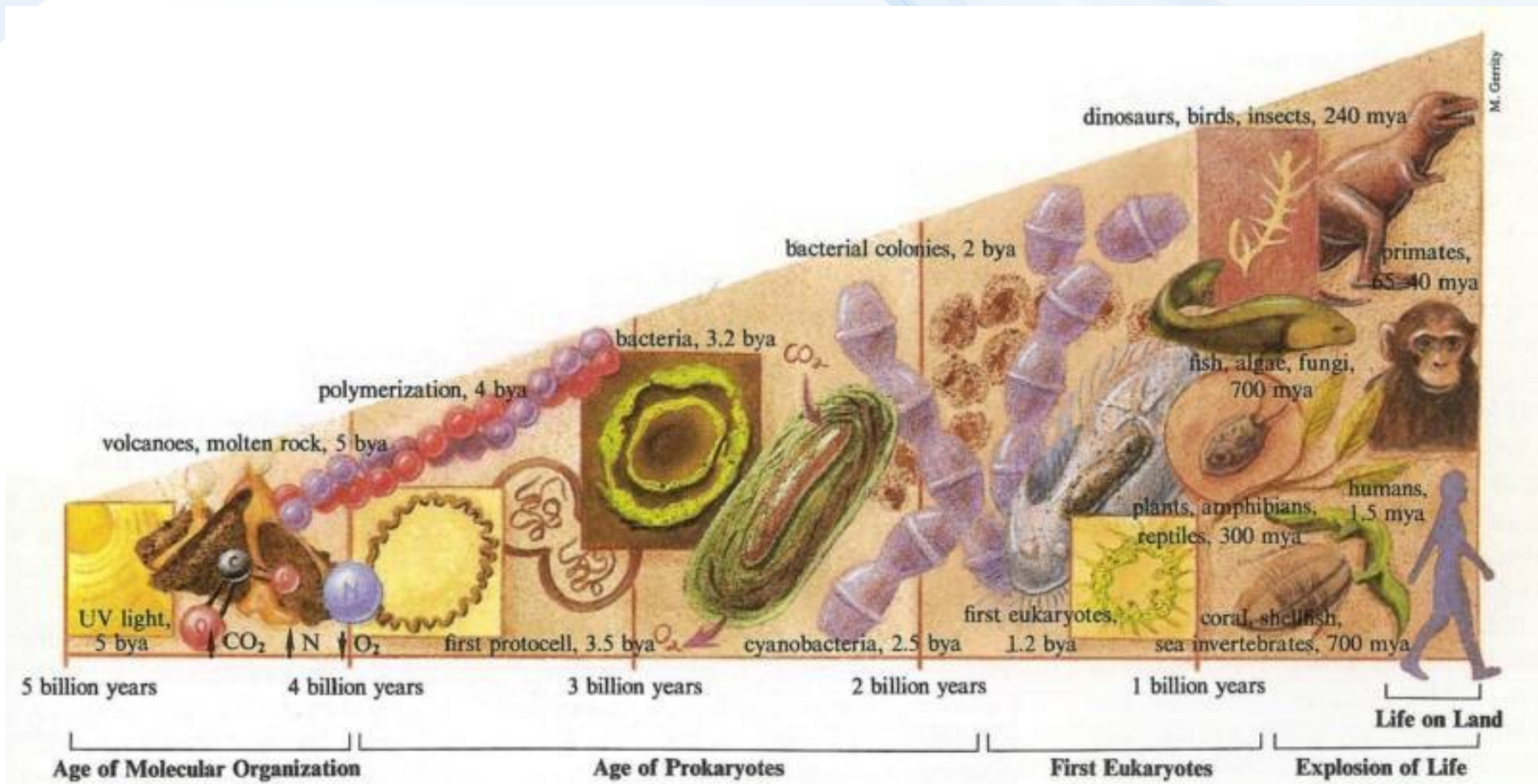


Mapping microbial diversity. The relative abundance of microbial taxa can be described with abundance distributions. The total number of species is the area under the taxa plot line. The precise shape of any given curve will depend on the parameters selected. In all cases, the majority of the biomass that we can most readily observe (Terra Frequentata) make up a minority of the diversity. Most taxa are very hard to find by random sampling (Terra Incognita).



Co jsou mikroorganismy?

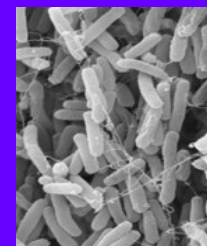
- nejstarší obyvatelé planety
- podstatně měnili globální charakter planety



Key
millions of years ago = mya
billions of years ago = bya

Mikroorganismům patří naše historie

Billion years ago		
3.6	Jan.	The beginning of life
3.3	Feb.	Development into Bacteria and Archaea
3.0	Mar.	
2.7	Apr.	Cyanobacterial growth and O ₂ formation
2.4	May	
2.1	June	Large scale evolution of Bacteria
1.8	July	<i>Prokaryote period</i>
1.5	Aug.	Birth of eukaryotes
1.2	Sept.	Beginning of mitochondrial and chloroplast symbiosis with eukaryotes
0.9	Oct.	Birth of multi-cellular eukaryotes <i>Microorganisms period</i>
0.6	Nov.	Cambrian's explosion, 11/20 Land plants evolve, protected by ozone
0.3	Dec.	12/9 Birth of dinosaurs, 12/25 Extinction of dinosaurs
Present	-	12/31, 12:00 Birth of humans, 23:30 Birth of modern people



Evoluce mikroorganismů

- existují už 3,5 miliard let (pro srovnání: vícebuněčné organismy „jen“ 0,6 mld let)
- evoluce všech základních biochemických mechanismů byla „složitější“ (tím pádem i delší) než evoluce všech forem života, jak je známe dnes
- ještě před rozštěpením na další větve již muselo existovat:
 - DNA - nese dědičnou informaci (je stabilnější)
 - RNA – přenos informace z DNA do bílkoviny
 - ATP - nosič energie
 - H⁺ transportní systémy – z potenciálu H⁺ chemická energie
 - glykolýza – „neefektivní“ zisk energie z chemických látek
 - cyklus trikarboxylové kyseliny – dokonalé využití energie org. látek
 - fotosyntéza - fotoautotrofie
 - Calvinův cyklus - fixace CO₂



Fyziologická evoluce

- metanogenní archaebakterie
 - glykolýza, kvašení
 - anaerobní respirace využívající S a produkující H_2S
 - fotosyntéza - fotosystém II
 - sinice - fotosyntéza - fotosystém I
- } H_2S je donor elektronů
- fotosyntéza s vodou jako donorem elektronů (cca 2 - 2,5 mld let)
 - O_2 je stále toxický pro většinu bakterií
 - vznik kyslíkové atmosféry => snížení UV 200 nm => snížení abiotické syntézy organických látek => vznik potravních sítí
 - vznik fixace N_2 (nutná ochrana enzymu nitrogenázy před O_2)
 - procesy oxidace - chemoautotrofie - oxidace anorganických látek
 - procesy oxidace - heterotrofie - oxidace organických látek

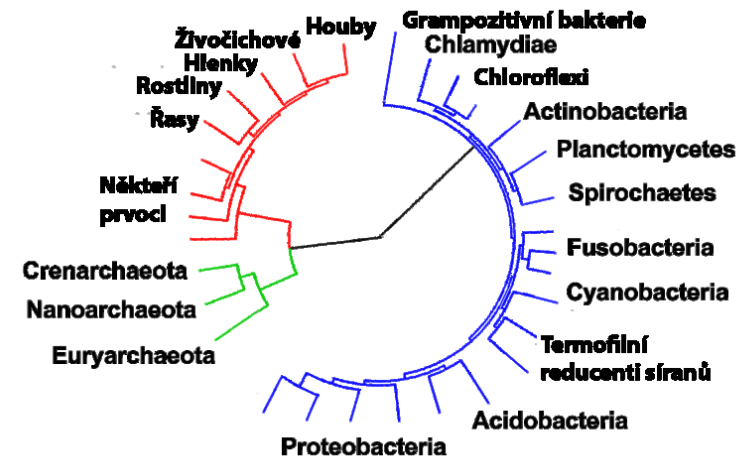


Výhody mikroorganismů v evoluci

- M.W. Beijerinck: "Everything is everywhere, the environment selects"
- mnohem kratší generační doba (30 min) než u vyšších organismů → změny v genetické informaci se mohou velmi rychle uchytit a rozšířit (příklad - mikrobiální resistance vůči antibiotikům) → obrovská přizpůsobivost
- genetická variabilita je základ evoluce - u prokaryot jsou zodpovědné zejména mutace (hlavně vliv prostředí - tzv. periodická selekce), kdežto u eukaryot jsou to rekombinace (menší vliv prostředí)
- víceméně všude nějaká forma sexuálního procesu: konjugace, spájení apod. → výměna DNA
- **tyto vlastnosti se mimo jiné také silně projevují v jejich ekotoxikologii → specifika ekotoxikologie MO**

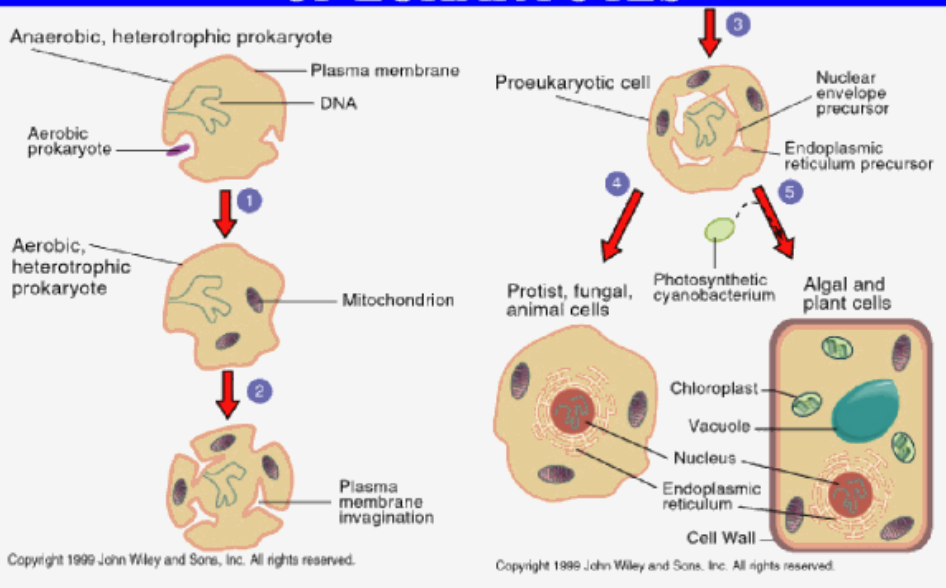
Evoluce Eukaryot

- cca před 2 mld let
- spojovací články byly Archea - některé znaky bct (chybí mitochondrie, mají 70S ribozómy, nemají Golgiho aparát)
- prvoci se objevují jako první eukaryota (bičík 9+2, fagocytóza atd. atd. ...) a „nejmladší“ jsou bičíkovci
- následují chromista (rozsivky a ruduchy) a zelené řasy
- houby, živočichové a rostliny
- houby před 400 mil let z prvoků (chitin v buň. stěně) - „nejmodernější“ mikroorganismy
- kvasinky jako jednobuněčné organismy až druh



Endosymbiotická teorie

ONE SCENARIO FOR SYMBIOTIC ORIGIN OF EUKARYOTES



From:
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect06.htm>

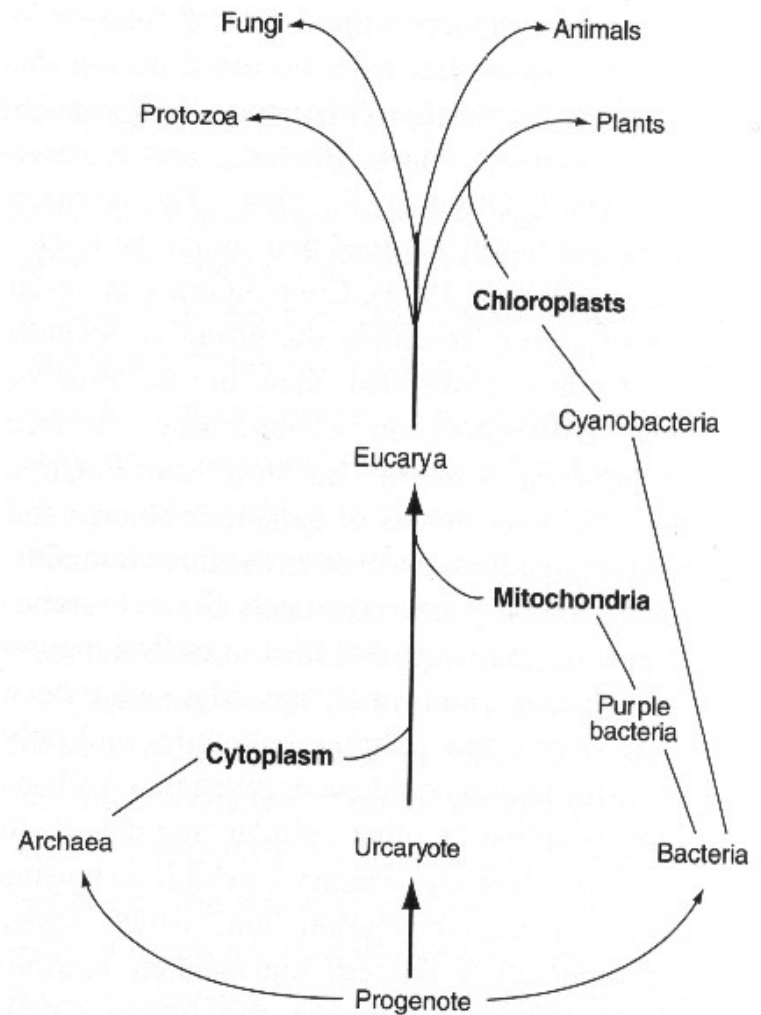


Figure 2.4

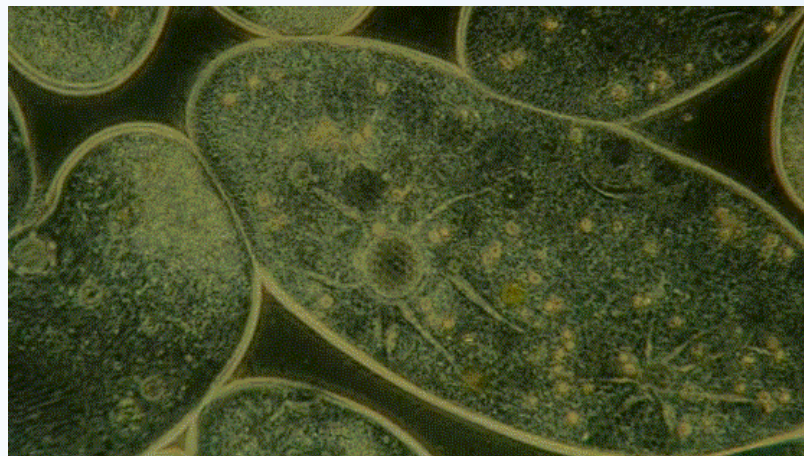
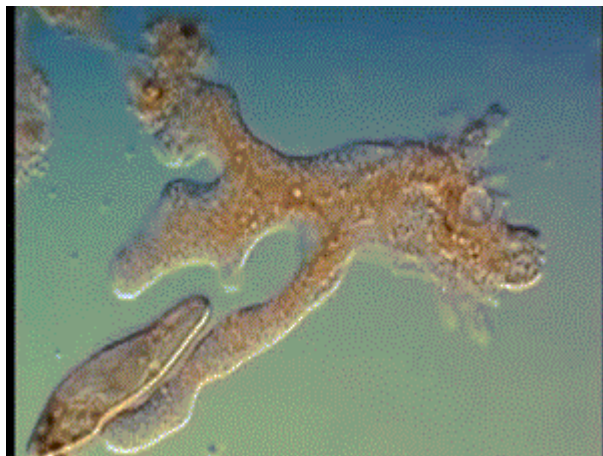
The evolution of the Eucarya, involving acquisition of cytoplasm and organelles from Bacteria and Archaea (Source: Woese et al. 1990.)

From: Atlas and Bartha (1997): Microbial Ecology: Fundamentals and Applications



Co jsou mikroorganismy?

- Polyfyletická skupina = nemá taxonomický význam – velmi různorodá skupina organismů
- Mikroorganismy = jednotlivé organismy nejsou viditelné pouhým okem
- primárně **jednobuněčné organismy**
- Sekundárně (pseudo)vícebuněčné – vlákna sinic, hyfy hub ...
- Nemusí ale nutně mít nejjednodušší typ buňky! (např. nálevník)



Co jsou mikroorganismy?

- Zahrnují organismy ze skupiny prokaryota (doména *Bacteria* a *Archaea*) i eukaryota (doména *Eucarya*)
- V prostředí zejména tyto skupiny:
 - Bakterie (doména *Bacteria*)
 - Aktinomycety (řád G+ bakterií *Actinomycetales*)
 - Sinice (kmen G- bakterií – *Cyanobacteria*)
 - Prvoci (říše *Protozoa*)
 - Řasy (říše *Protozoa*, říše *Chromista*, říše *Plantae*)
 - Houby (říše *Fungi*), kvasinky
- Taxonomicky nejednoznačné zařazení
 - mění se na základě aktuálního poznání ...
 - definice taxa u bakterií je jiná než známe z klasické taxonomie: druh bakterií – seskupení sdílející vysokou úroveň fenotypové podobnosti a současně se lišící od zbývajících seskupení v tom samém rodu (Sedláček, 2007)
 - dnes často vychází z fylogeneze a analýzy DNA (16S rDNA u bakterií ...)



Moderní rozdělení – 3 skupiny (domény)

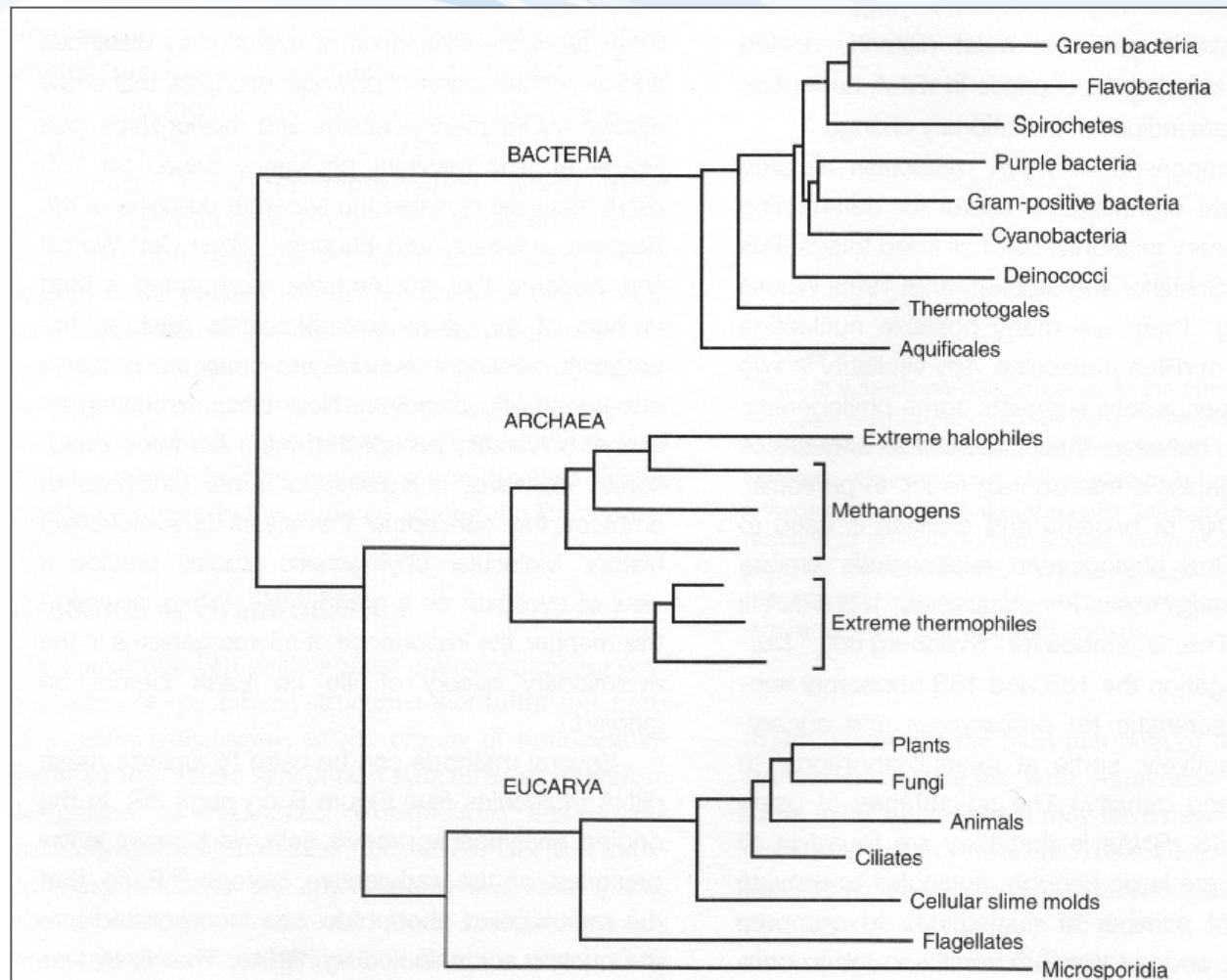


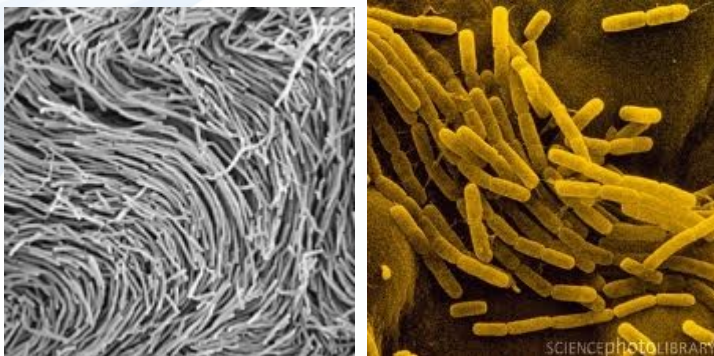
Figure A

The three domains of life (Bacteria, Archaea, and Eucarya) and the major evolutionary lines of descent within those domains. (Source: Based on Woese et al. 1992.)

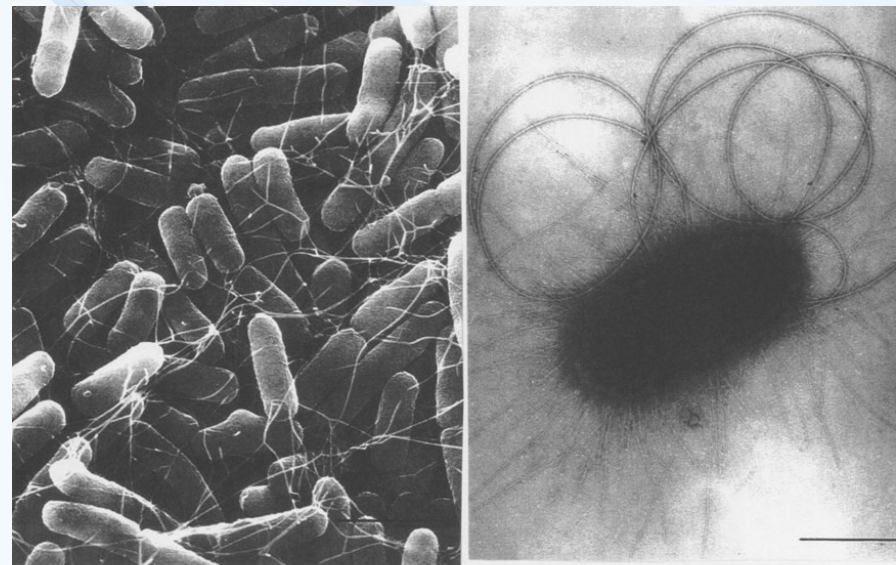


Bakterie

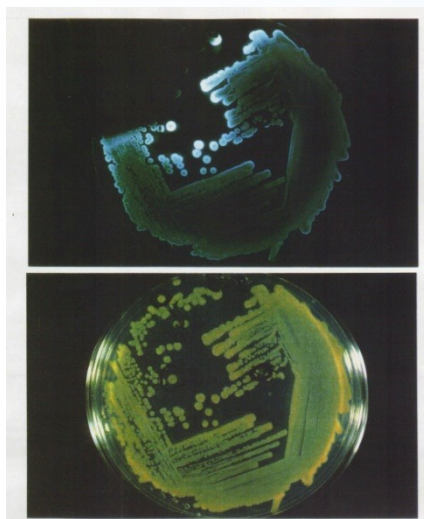
Bacillus cereus



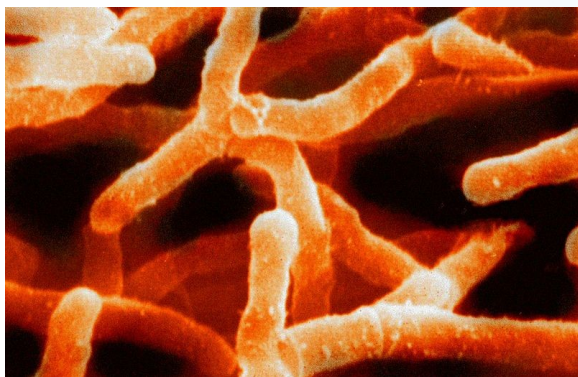
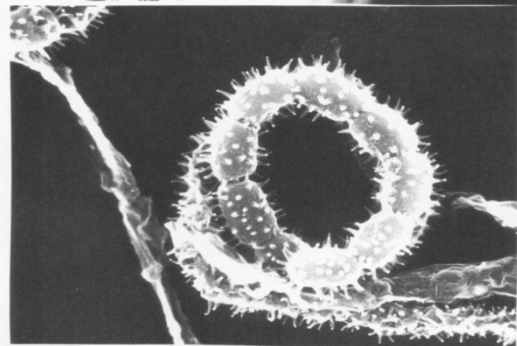
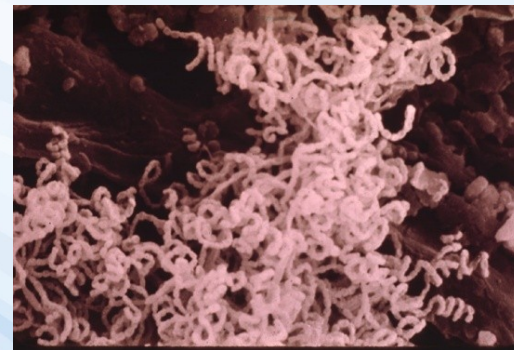
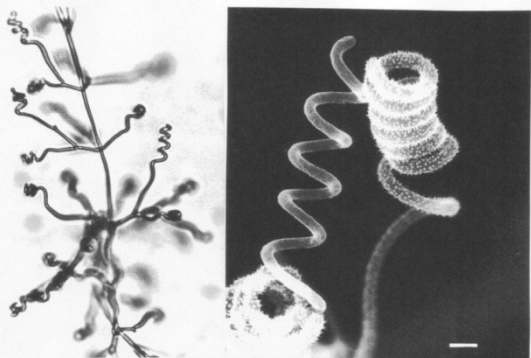
Escherichia coli



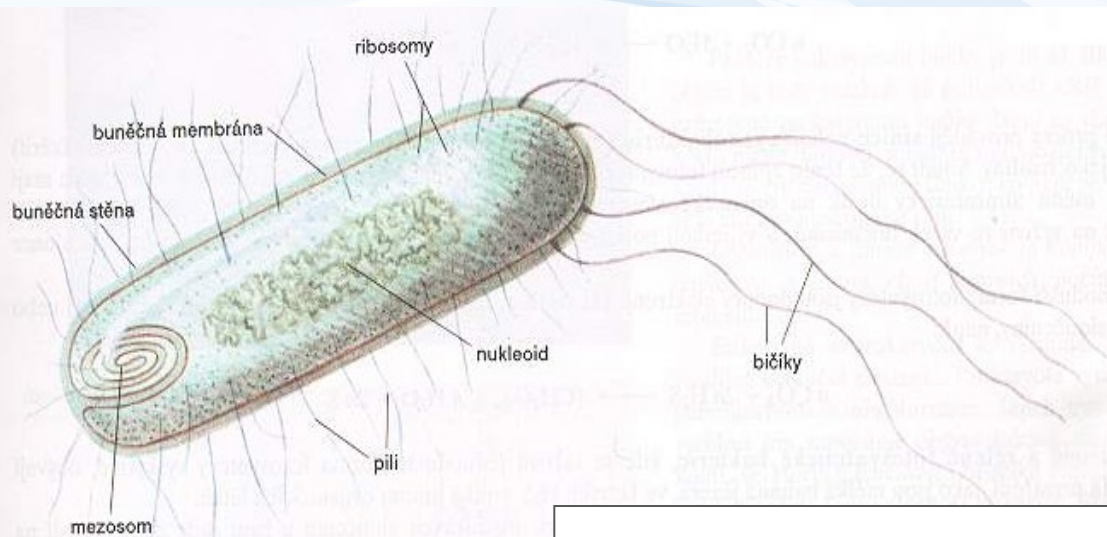
Vibrio fischeri



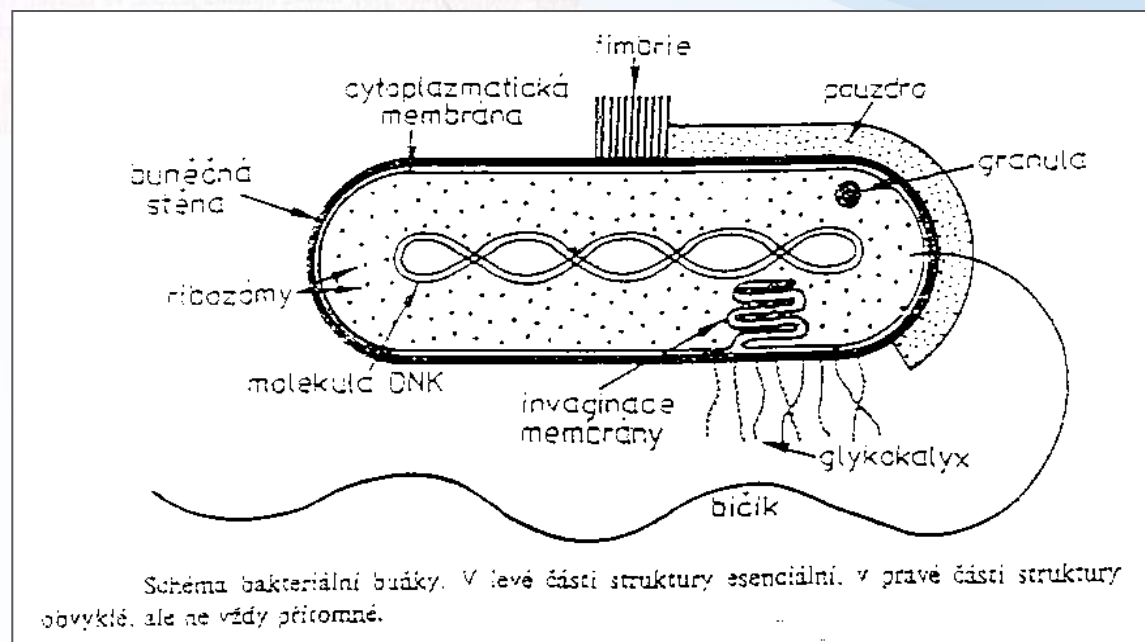
Aktinomycety



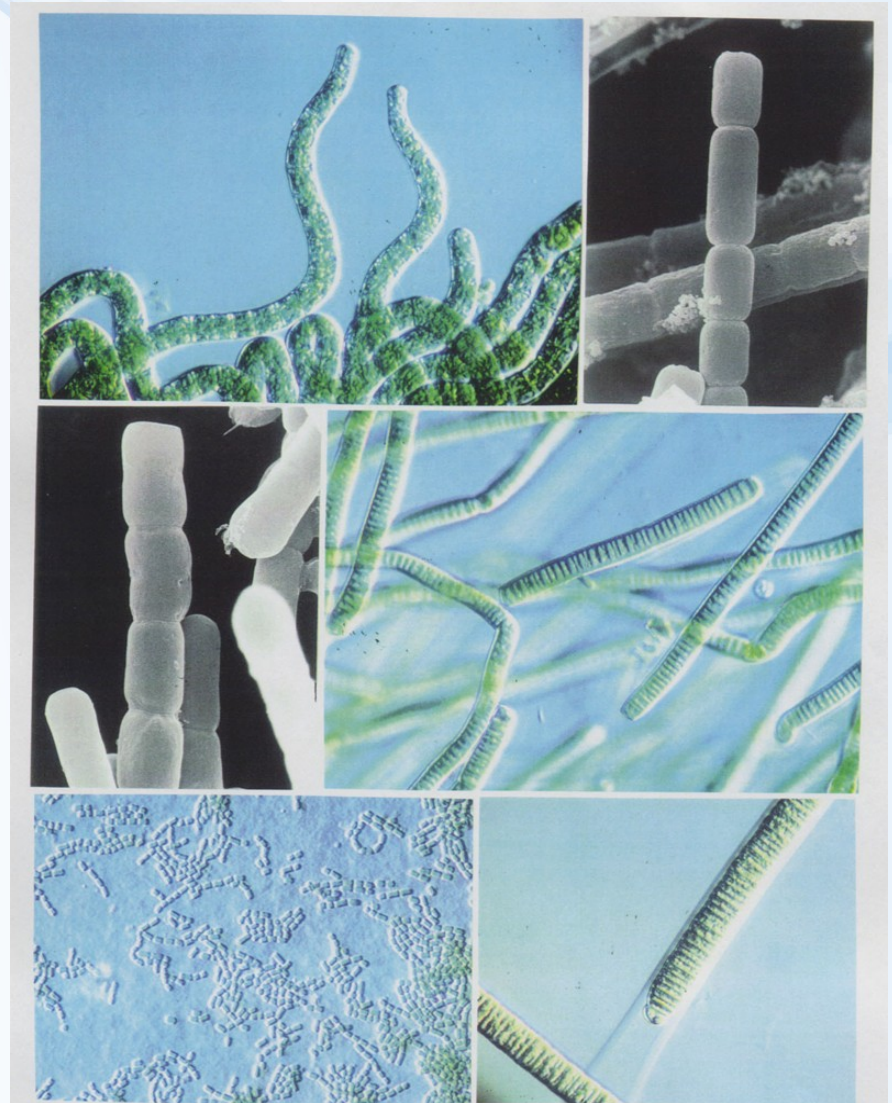
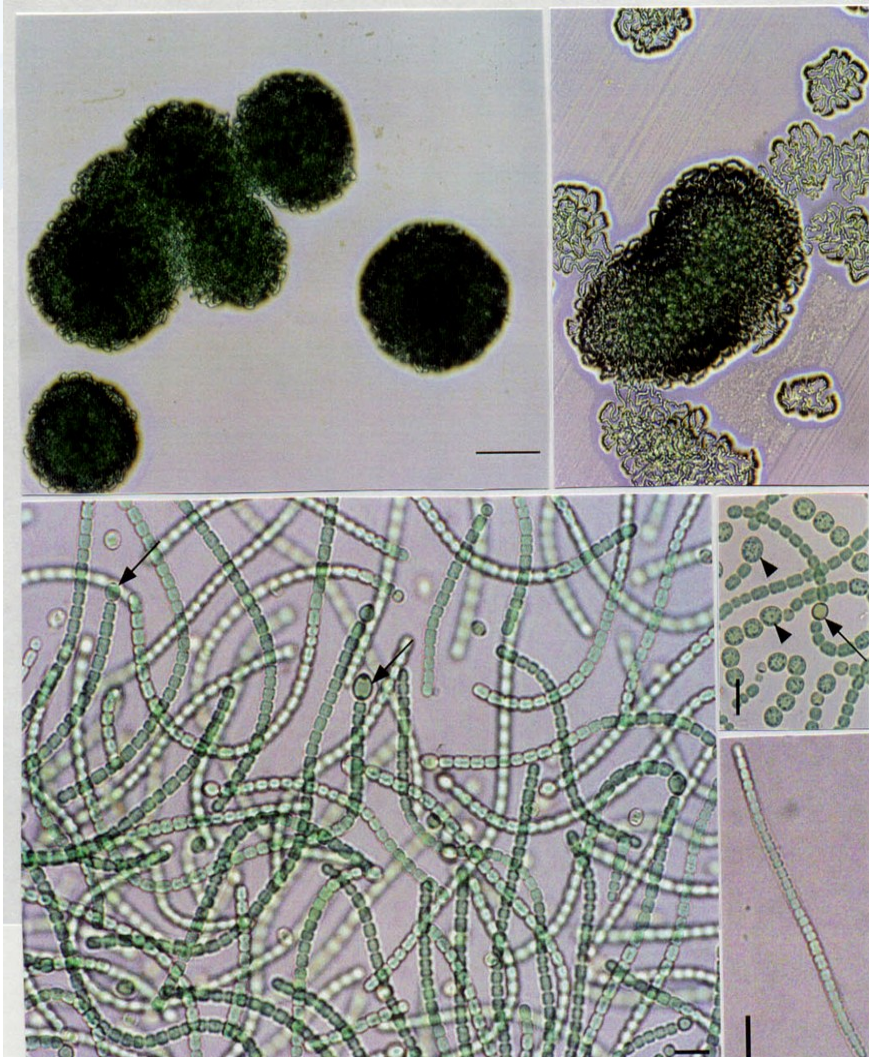
Bakterie



Obr. 1-2
Schéma prokaryotní buňky.



Sinice



Prvoci

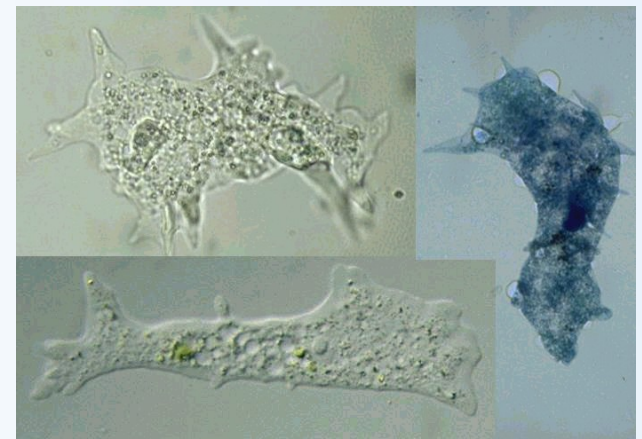
trepka Paramecium



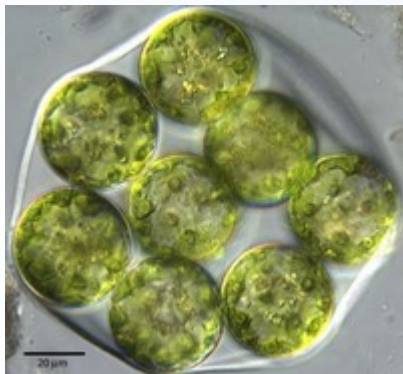
Amoeba proteus



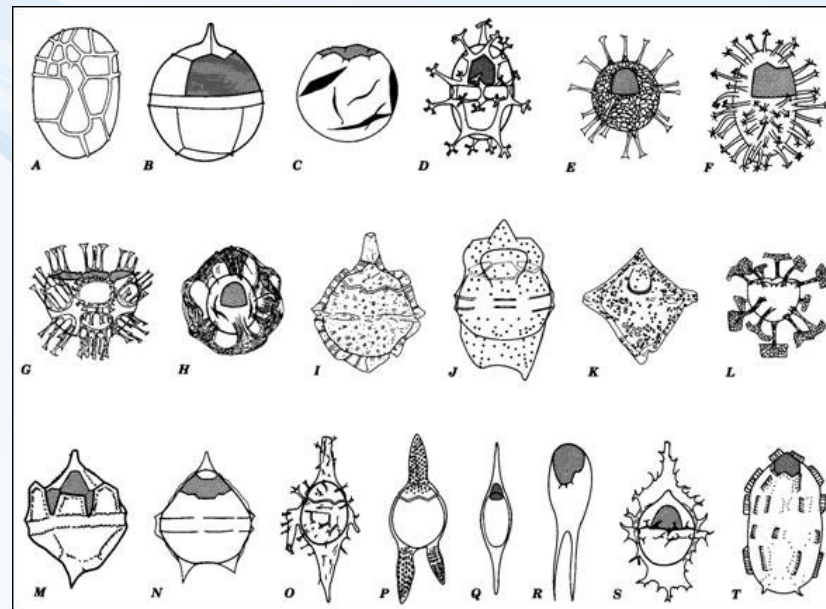
Amoeba



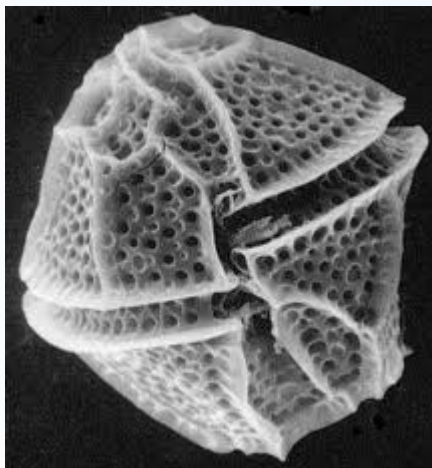
Řasy



euglena



dinophyta



rozsivka



Prvoci, řasy

STRUCTURE OF A PARAMECIUM

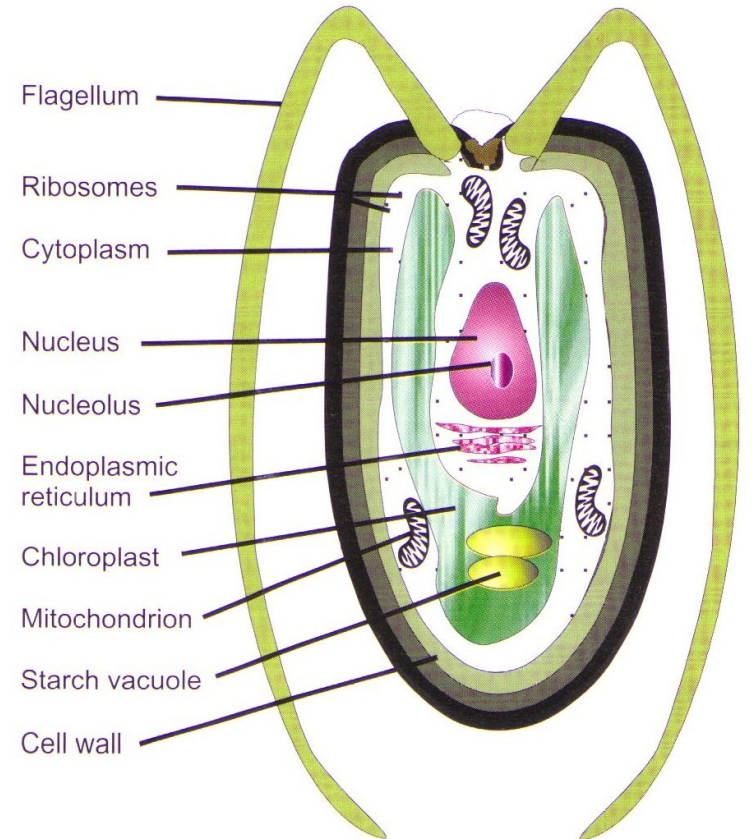
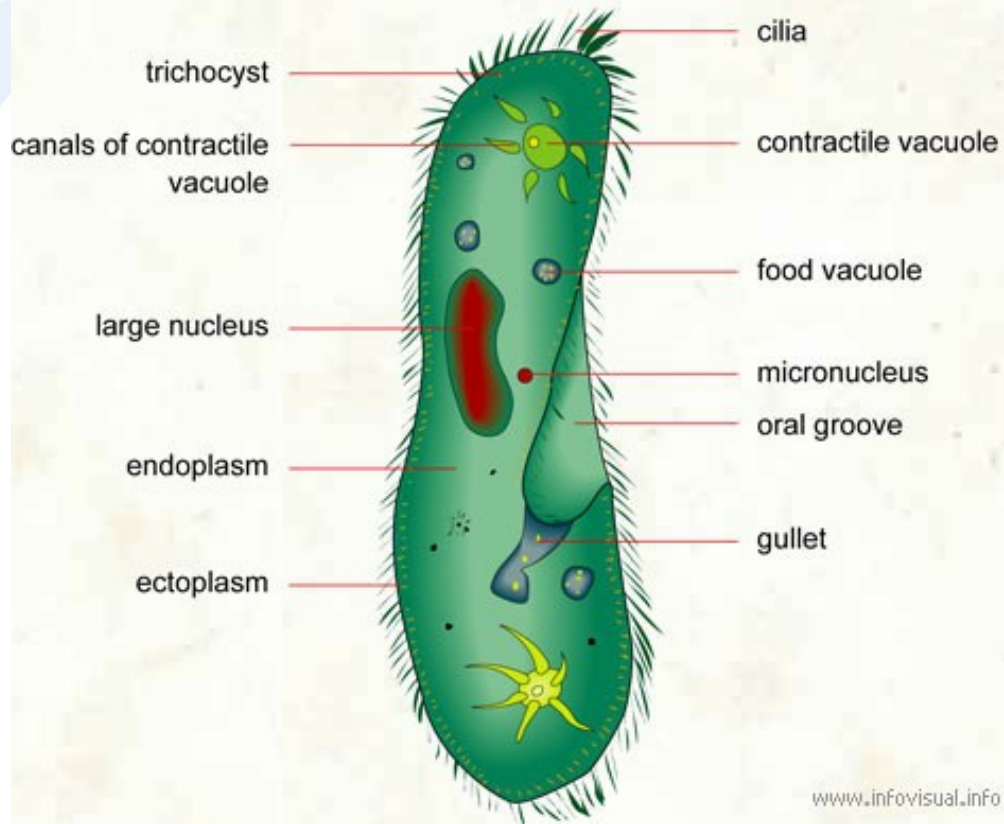


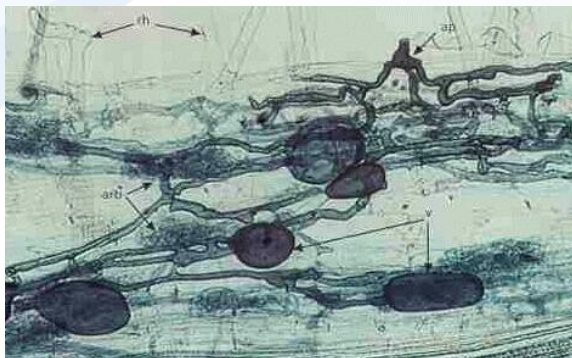
FIGURE 2.18 Structure of a typical algal cell.

From: Maier et al. (2000): Environmental Microbiology, Academic Press

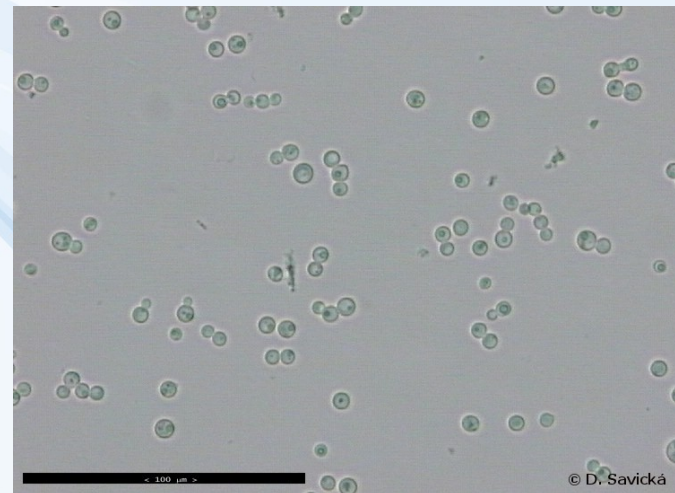


Houby

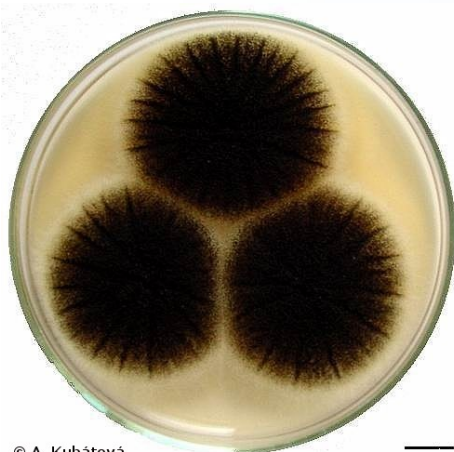
mykorrhzyza (houba a jetel)



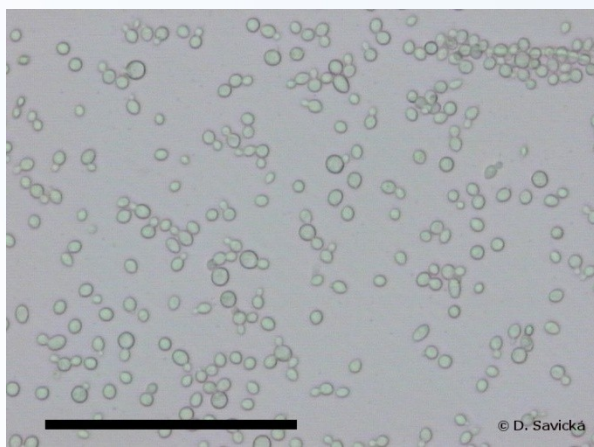
Candida globosa



Aspergillus niger



Saccharomyces cerevisiae



Houby

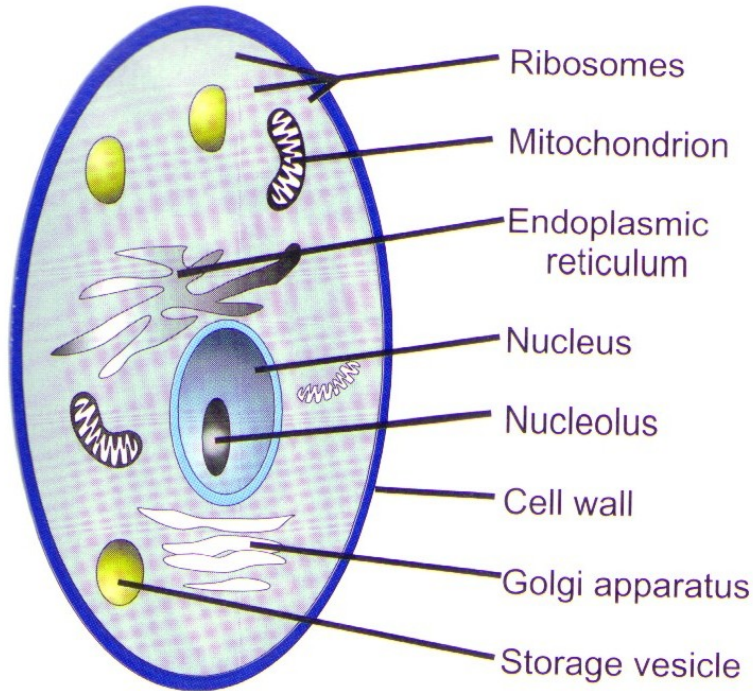


FIGURE 2.16 Structure of a typical fungal cell.

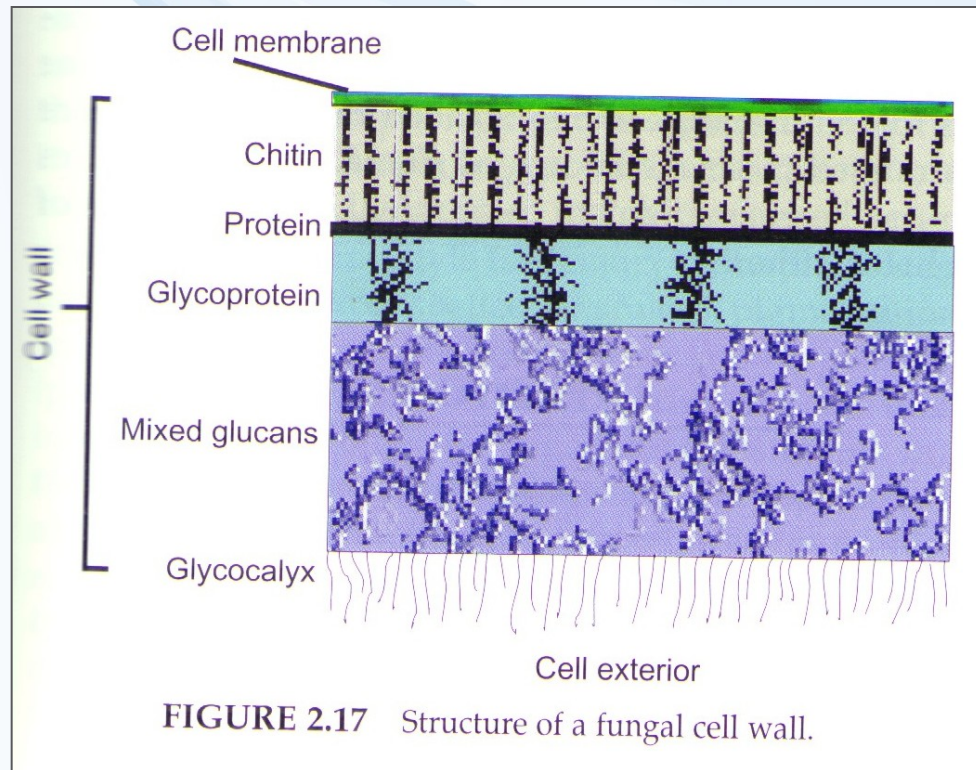


FIGURE 2.17 Structure of a fungal cell wall.

From: Maier et al. (2000): Environmental Microbiology, Academic Press

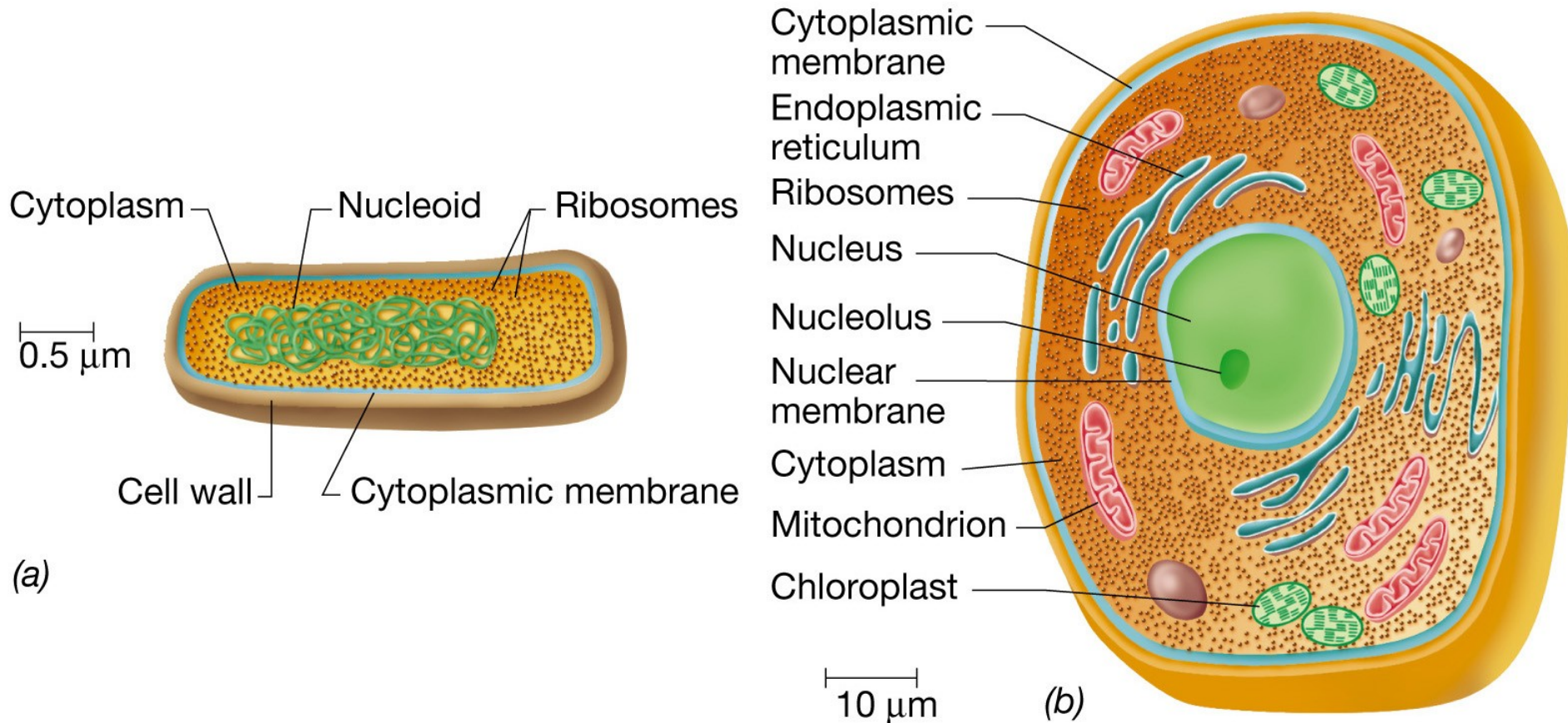


Stručné přestavení půdních mikroorganismů

- Aktinomycety
 - <http://www.agron.iastate.edu/~loynachan/mov/flash/actinomycetes.html>
- Řasy a sinice
 - <http://www.agron.iastate.edu/~loynachan/mov/flash/cyano-algae.html>
- Bakterie
 - <http://www.agron.iastate.edu/~loynachan/mov/flash/bacteria.html>
- Houby
 - <http://www.agron.iastate.edu/~loynachan/mov/flash/fungi.html>
- Prvoci
 - <http://www.agron.iastate.edu/~loynachan/mov/flash/protozoa.html>



Prokaryota (a) vs Eukaryota (b)



Srovnání prokaryota vs. eukaryota

- velikost cca 1 μm

- cytoplazmatická membrána

- základní cytoplazma

- buněčná stěna

(peptidoglykan - murein, G^+ a G^-)

- vakuoly

- bičíky

(jednoduchý)

- ribosomy

(volné, sedimentační koeficient 70S: 5, 16 a 23S)

- jádro

(velmi dlouhá kruhová DNA - nukleoid, haploidní ...)

+ mají plasmidy

- buněčné inkluze

- velikost cca desítky μm

- cytoplazmatická membrána

- základní cytoplazma

- buněčná stěna

(nemá peptidoglykan, houby mají chitin)

- vakuoly

- bičíky

(9+2 uspořádání)

- ribosomy

(vázané na ER, 80S)

- jádro

(2 membrány, póry, chromozómy, histony ...)

- buněčné inkluze

- mitochondrie

- ER

- jaderná membrána

- Golgiho aparát

- plastidy

- dělicí vřeténko



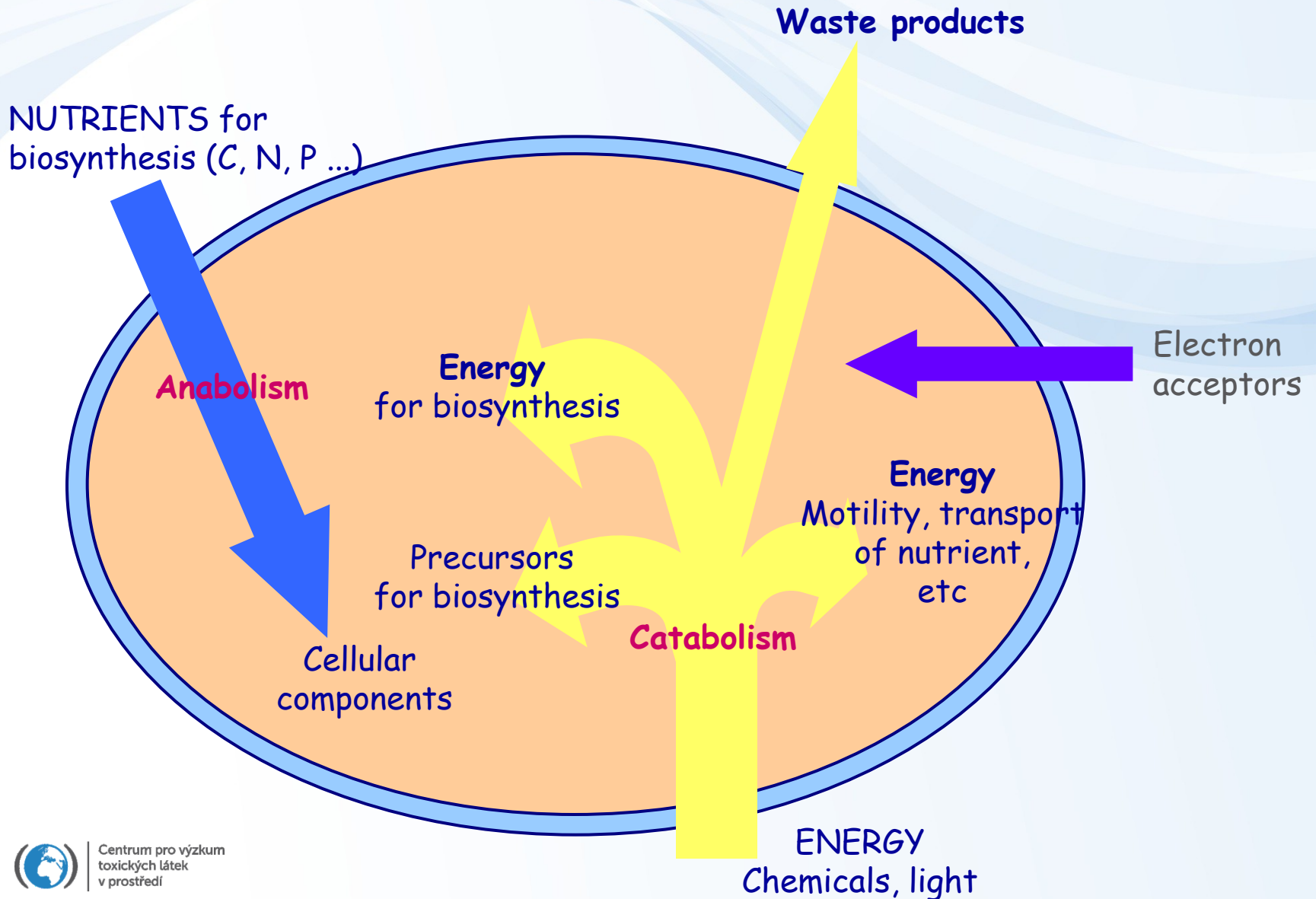
Srovnání prokaryota vs. eukaryota

Příklad rozdílných charakteristik prokaryot a eukaryot:

Znak	prokaryota	eukaryota
Nukleoplazma oddělena jadernou membránou	-	+
Mitochondrie, ER přítomné	-	+
Lokalizace ribozomů:		
v cytoplazmě	+	-
připojené k ER	-	+
Steroly přítomny v membráně	-	+
Buněčná stěna obsahuje peptidoglykan	variabilní	-
Respiratorní a fotosyntetická funkce pigmentů a enzymů	+	-
Chloroplasty u fototrofů	-	+
Buňky se dělí mitoticky	-	+
Kruhový chromozóm	+	-
Lineární chromozóm	-	+
Sedimentační konstanta ribozomů:		
70S	+	-
80S	-	+
Sedimentační konstanty ribozomální RNA:		
16S, 23S, 5S	+	-
18S, 28S, 5,85S, 5S	-	+



Metabolismus mikrobiálních buněk obecně



Autotrofie

Všechny buněčné složky syntetizují z anorganických látek (H_2O , CO_2 , NH_3 a H_2S).

Podle zdroje energie:

1) Fotoautotrofie (fotolitotrofie)

- zdroj E je světlo, fotosyntéza, Calvinův cyklus fixace CO_2
- bct. mají **bakteriochlorofyl** a zdroj H a e- je H_2S či H_2
- sinice + rostliny mají **chlorofyl** a zdrojem H a e- je H_2O

2) Chemoautotrofie (chemolithotrofie)

- pouze u některých bakterií - energie z oxidace anorganických látek (H_2 , S, Fe^{II} , Mn^{II} , NO_2^- , NH_4^+ , H_2S , CH_4 , CS_2 , CHOH atd.) molekulovým kyslíkem - striktně aerobní
- velmi malá energetická účinnost (jen 8% celkové energie) - evolučně nevýhodné, citlivé vůči stresu
- CO_2 je zdroj uhlíku



Heterotrofie

Potřebují organické látky, které nejsou schopni syntetizovat

Podle zdroje energie

1) Fotoorganotrofie

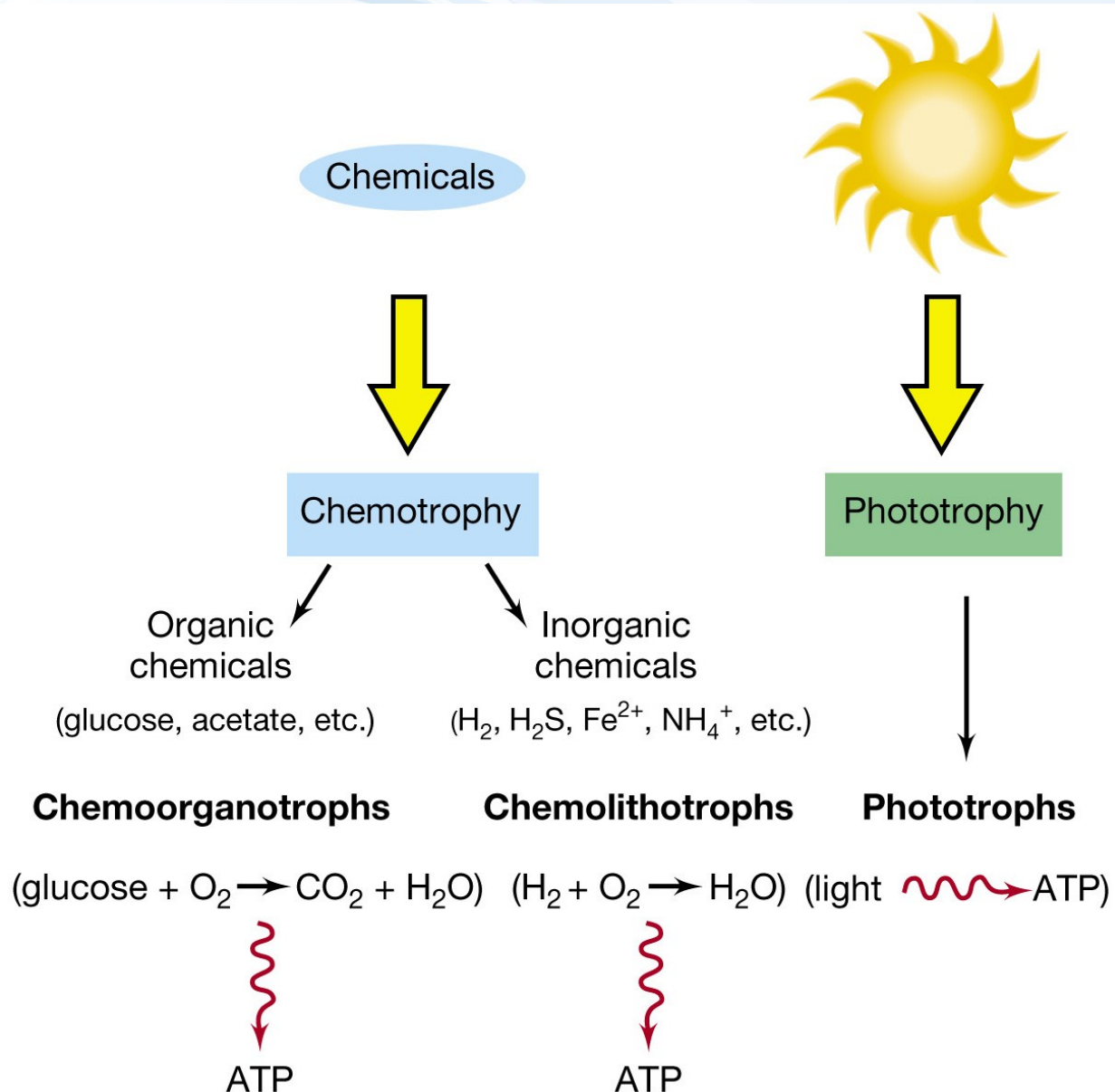
- zdroj energie je světlo, ale zdroj uhlíku není CO_2 ale acetát, pyruvát, fumarát apod., které slouží také jako donor vodíku

2) Chemoorganotrofie

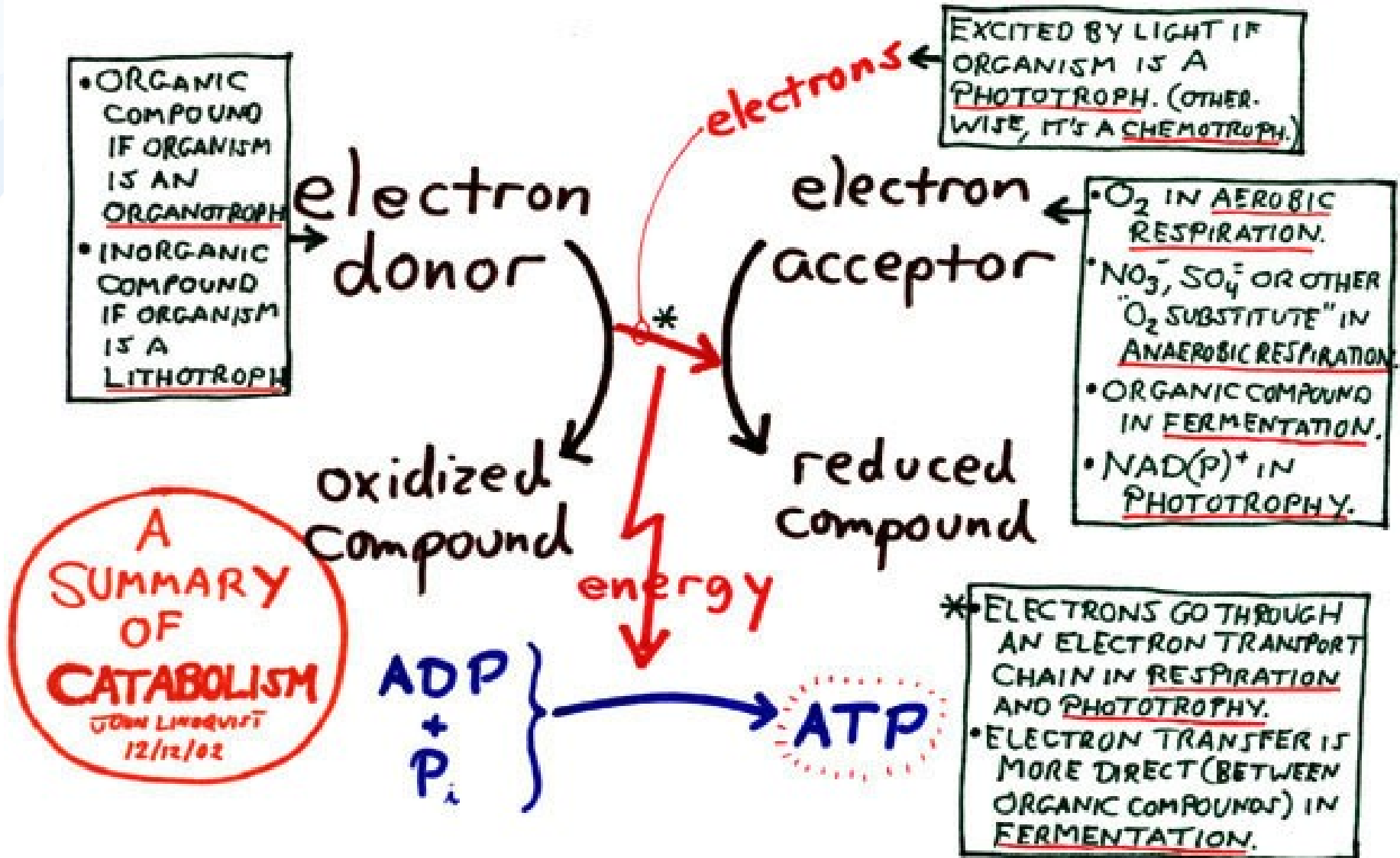
- většina bakterií a všechny houby a živočichové
- zdrojem E je oxidace redukované organické látky, která je zároveň zdrojem uhlíku
- **aerobní respirace** (oxidace) - kyslík molekulový jako akceptor elektronů
- **kvašení** – akceptor elektronů je organická látka, není elektronový transportní řetězec
- **anaerobní respirace** (oxidace) - kyslík z anorganických látek jako akceptor elektronů (denitrifikace, desulfurikace apod.)



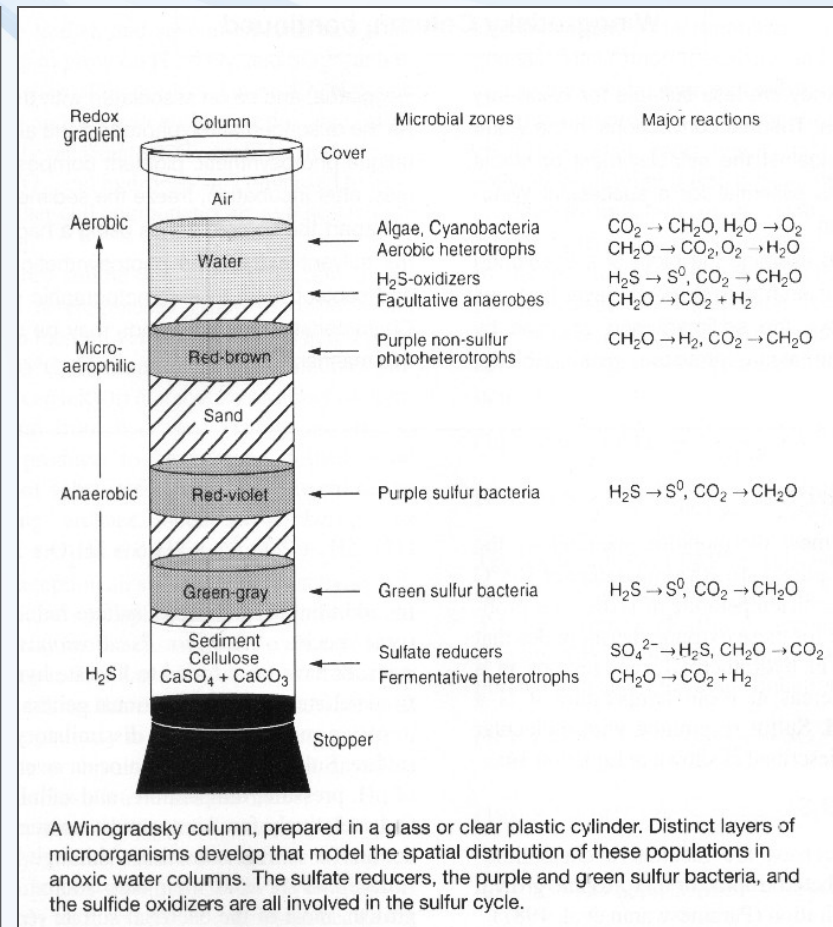
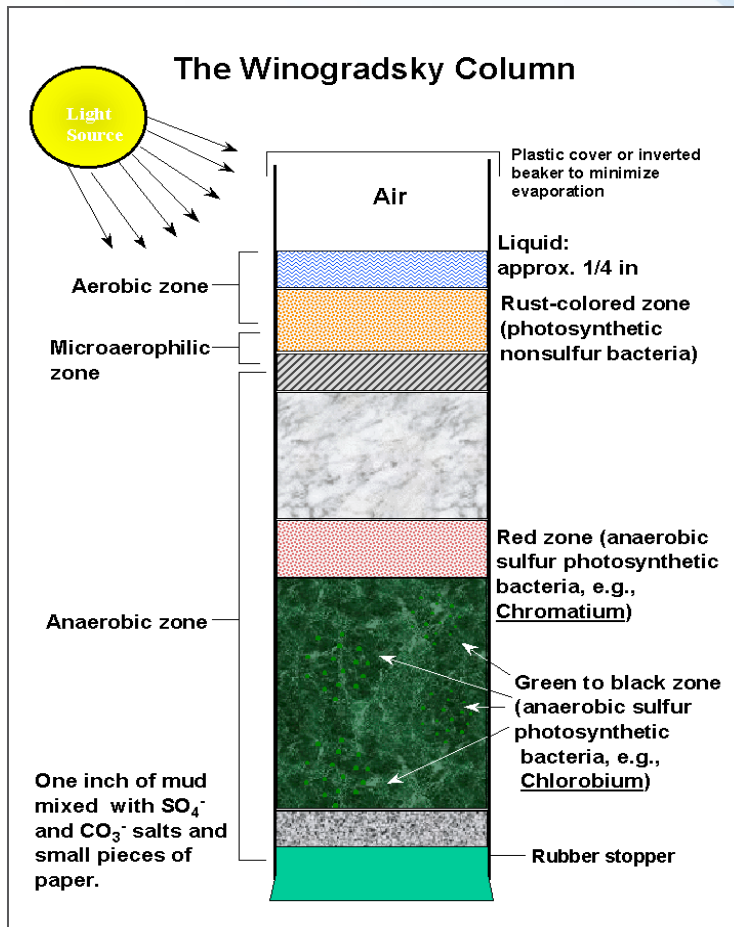
Souhrn variant metabolismu



Souhrn metabolismu

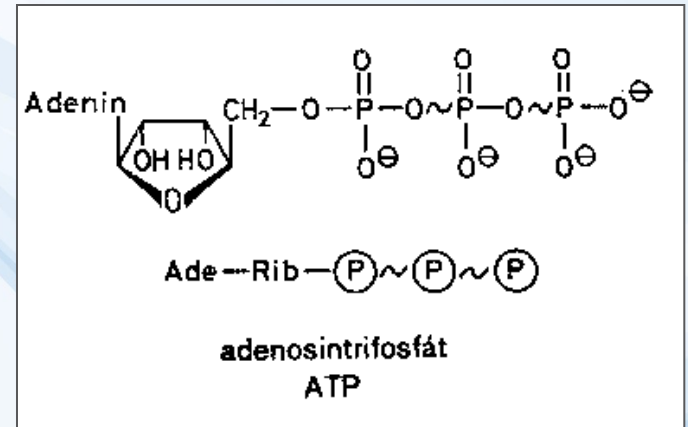


Faktor prostředí pro metabolismus MO



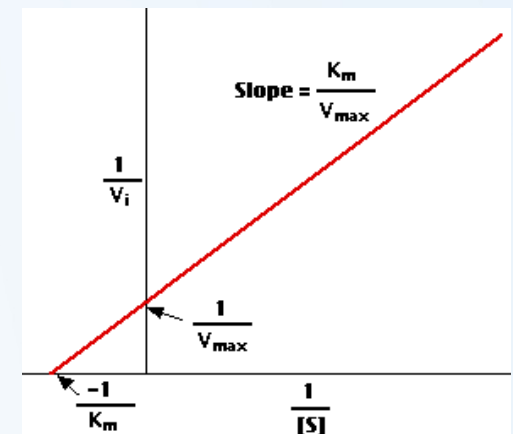
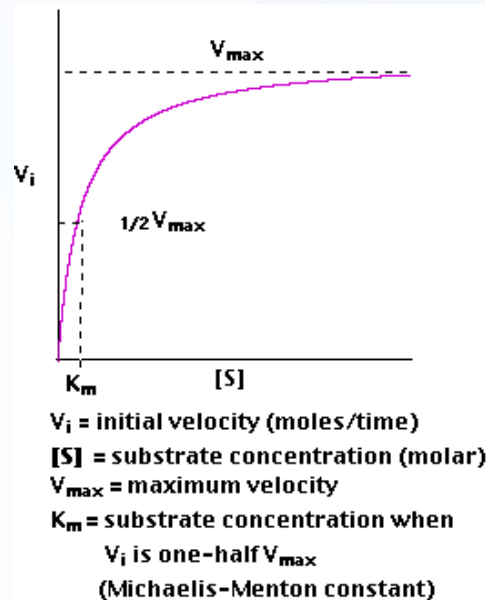
Připomenutí základní biochemie – ZOPAKOVAT!

- ATP, ADP, AMP
- glykolýza (1 glukóza = 2 ATP)
- Krebsův cyklus (1 glukóza = 38 ATP)
- Fotosyntéza
- Calvinův cyklus
- syntéza bílkovin (transkripce, translace)
- enzymová kinetika



$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{S} \cdot \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}}$$



Mikroorganismy v ŽP

Mikroorganismy jsou součástí prostředí

Mají - li být reakce mikroorganismů studovány v reálném prostředí,

NELZE je chápat odděleně od vlastností a změn prostředí samotného

Naopak: variabilita vlivem faktorů prostředí často zastíní efekt chemických látek v prostředí ...

Mikroorganismy jsou součástí prostředí a podílejí se na jeho vývoji.

**Proto je nutná znalost okolních faktorů prostředí.
= Environmentální mikrobiologie**



Vývoj mikrobiologie vs environmentální mikrobiologie

- mikrobiologie existuje už 300 let, mikrobiální ekologie ale až ve 20. století
- dlouho opomíjeny mikroorganismy jako složka ekosystému i přes jejich významné funkce
- důvod = "mikro" - nedostatek metod studia, nepostačující klasická ekologie; R. Koch založil techniky izolace a kultivace čistých kultur - dodnes se užívají; moderní techniky až v posledních 30 letech (např. PCR 1985)
- zlom na přelomu 20. století, uvědomění obrovského rozsahu aktivit mikroorganismů
- S. Winogradskij - sloupce víceméně uzavřený systém
- **mikrobiální ekologie**, na rozdíl od makroekologie, se odehrává až na odběr vzorků v laboratoři, postupy jsou složitější ...

Ekologie MO a environmentální mikrobiologie

Význam bakterií

- cykly prvků a látek
- fixace dusíku
- Dekompozice
- Symbiózy
- patogenní

Význam hub

- dekompozice (nabourání komplexů ligninu a humusových látek)
- Symbiotické
- Patogenní
- vyšší tolerance k pH než bakterie (v nižších pH dominují houby)

Význam prvoků

- potravní řetězce (predátoři + konzumenti + destruenti + producenti)
- konzumují bakterie – podporují jejich růst
- dekompozice OM
- fagotrofie a heterotrofie – cykly látek, uvolnění látek z bakteriální biomasy
- autotrofie – řasy - producenti

Ekologie MO a environmentální mikrobiologie

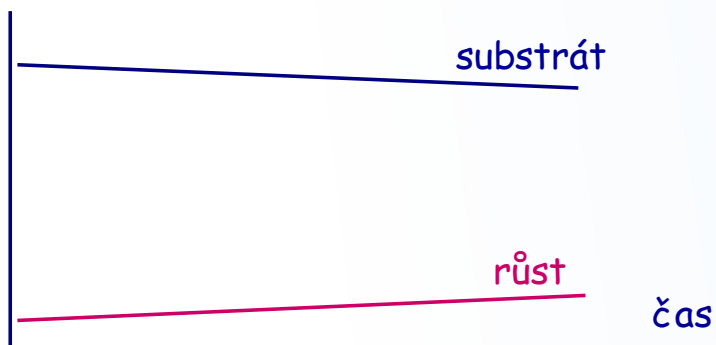
- obory související s ekotoxikologií MO
- „větší“ obory – vztah MO v prostředí v celé šíři (ekotoxikologie MO se soustředí spíše na toxické látky)
- existuje bohatá základna literatury (viz doporučená literatura předmětu)
- přednášky na PŘF:
 - Bi8420 Ekologie mikroorganismů
 - Bi6361 Mikrobiální ekologie vody



Ekologická klasifikace mikroorganismů

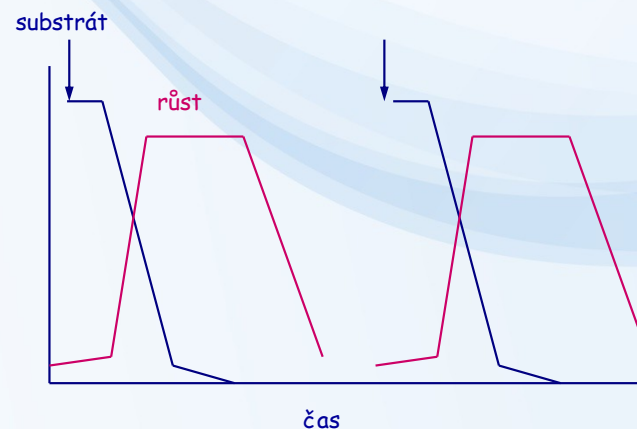
Autochthonní

- přirozeně se vyskytující
 - přežívají, rostou a jsou aktivní
- obsazují ekologické niky
 - podle fyz-chem vlastností jsou obsazeny kompatibilní fyziologií
 - Kompetice
- nízké ale konstantní aktivity



Zymogenní

- přirozeně se vyskytující
- periodická aktivita

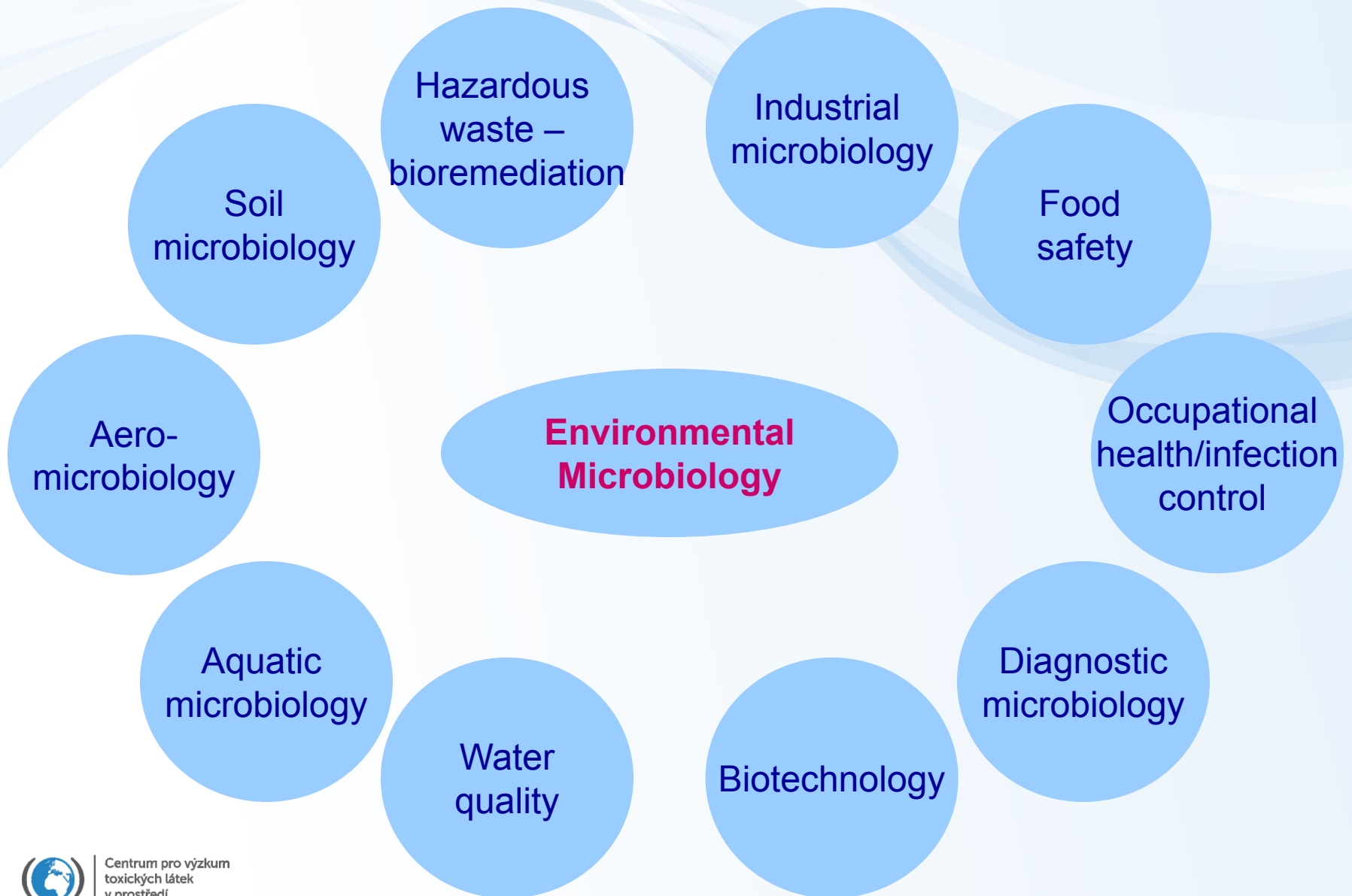


Allochthonní

- cizí
- přechodné, nestálé
- žádná funkční nika
- do ekosystému vnesené (např. *E. coli*)



Environmentální mikrobiologie a její aplikace



Ekotoxikologie MO jako obor

Ekotoxikologie MO jako obor

- Ekotoxikologie mikroorganismů není o působení mikroorganismů na jiné organismy, ani o toxinech mikroorganismů
- Zabývá se interakcemi mezi kontaminanty životního prostředí a mikroorganismy v prostředí

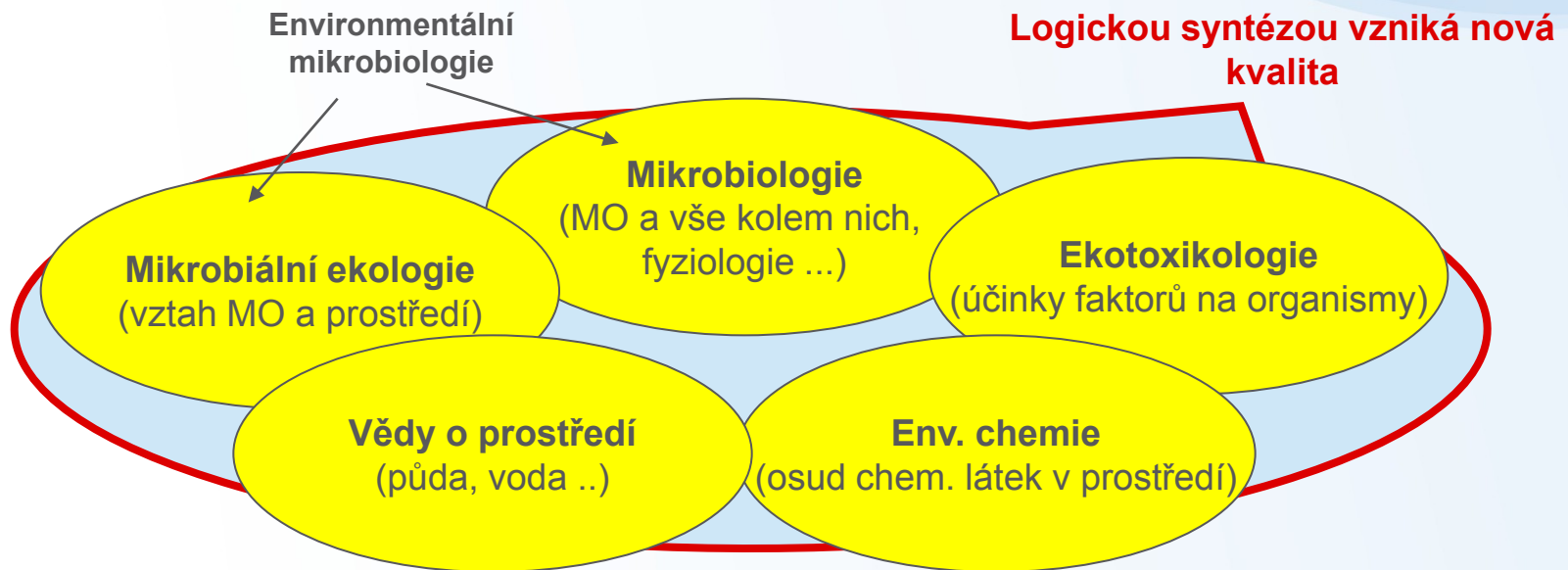
PROČ?

- Mikroorganismy jsou velmi významnou složkou všech ekosystémů
- Zastávají klíčové role ve fungování ekosystémů
- Narušením těchto dějů se narušuje stabilita celého ekosystému
- Mikroorganismy jsou schopny některé typy kontaminace snižovat, čehož lze využít při remediacích
- při narušení jejich základních funkcí: snížená metabolická aktivita, snížení recyklace materiálu v ekosystémech, neschopnost samočištění a biodegradací toxických látek



Úvod

- Ekotoxikologie MO je průnik několika uznávaných oborů
- Jejich znalost je podkladem pro chápání ekotoxikologie MO a to:
 - pro chápání sledovaných parametrů, jejich významu a dopadu efektů
 - pro chápání vztahů MO k prostředí a k chemickým látkám
 - principu testů a interpretace výsledků



Ekotoxikologie MO - současný stav a koncepční otázky

Současná mikrobiální ekotoxikologie a ekologie představuje rozvíjející se vědní obor s uceleným systémem verifikovaných základních metod.

Při určitém zjednodušení lze v současném stavu oboru vymezit základní myšlenkové i metodické linie:

- (1)** výzkum zaměřený na mikrobiální procesy v reálných ekosystémech nebo v celistvých vzorcích prostředí
- (2)** studie pracující s mikroorganismy izolovanými z prostředí, a následně zkoumanými z hlediska genetické, taxonomické nebo fyziologické diverzity
- (3)** Testy toxicity s mikroorganismy – využití v praxi
- (4)** Interakce mikroorganismů a kontaminantů v biodegradacích a bioremediacích

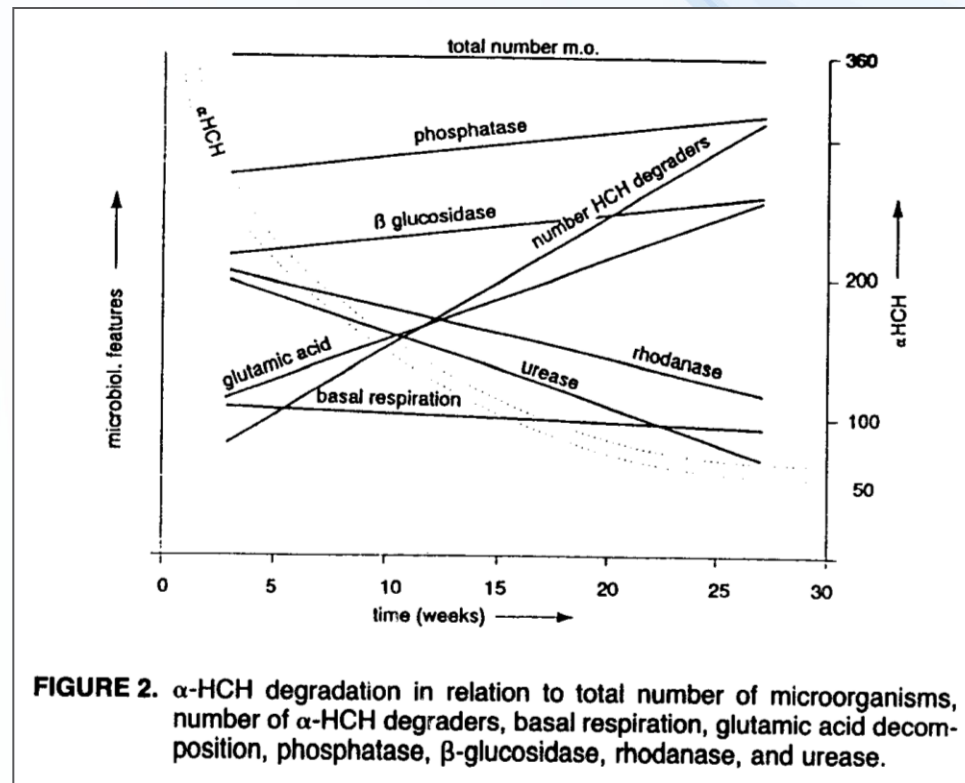


Proč mikroorganismy v ekotoxikologii ?

- většinou jednobuněčné → relativně **jednoduché interpretace výsledků**
- často haploidní genom → **fenotyp = genotyp**
- rychlý růst a možnost studovat několik generací v **krátké době**
- možnost studovat **celá společenstva a populace** v malém objemu, navážce
- možnost pracovat s **vysokou diverzitou a variabilitou** (vysoká funkční variabilita = široké spektrum energetických strategií, metabolických typů - autotrofie i heterotrofie - výhoda pro **vývoj nových testů**; **vysoká ekologická diverzita** - rozmanité a proměnlivé růstové/životní strategie)
- možnost studovat jak **specifické, tak obecné funkce**
- možnost studovat stejnou populaci **v reálném ekosystému i v laboratoři**
- mohou přežívat v těžce znečištěném prostředí – **vědecky a biotechnologicky důležité**

Proč mikroorganismy v ekotoxikologii

Výhodou mikroorganismů je, že umožňují najednou hodnotit velké množství parametrů i například současné hodnocení biodegradace organické látky a vlivu na mikrobiální procesy.



Proč mikroorganismy v ekotoxikologii?

Bakteriální buňka je relativně malá, má však velký specifický povrch:

Příklad: Chlamydia: $0,3 \times 0,3 \mu\text{m}$; E. coli: $2-3 \mu\text{m} \times 0,4-0,6 \mu\text{m}$; Chromatium: $25 \times 10 \mu\text{m}$

Buňka	Průměr (μm)	Povrch (μm^2)	Objem (μm^3)	Specifický povrch (μm^{-1})
Rickettsie	0,3	0,3	0,01	30
Typický kokus	1	3	0,5	6
Kvasinka	10	314	523	0,6
Jaterní buňka	20	1256	4187	0,3

Vzhledem k tomu jsou minimalizovány časy potřebné na proniknutí látky do buněk a roste pravděpodobnost rychlé kolize s vnitrobuněčnými receptory

Vysoká pravděpodobnost reakce povrchu buňky s aktivními látkami



Proč mikroorganismy v ekotoxikologii?

Je velmi vysoká rychlost metabolismu (anabolismu i katabolismu)

Rychlost metabolismu prokaryot navozuje energetické aspekty vlivu stresových faktorů (jsou citlivější)

Buňka	Rychlost dýchání (ml O₂ . h⁻¹ . mg⁻¹_{suš.})
bakteriální	300
srdeční	3
jaterní	1



Specifika ekotoxikologie mikroorganismů

Environmentální znečištění u mikroorganismů působí jako stresový faktor vyvolávající selekci resistantních kmenů a druhů:

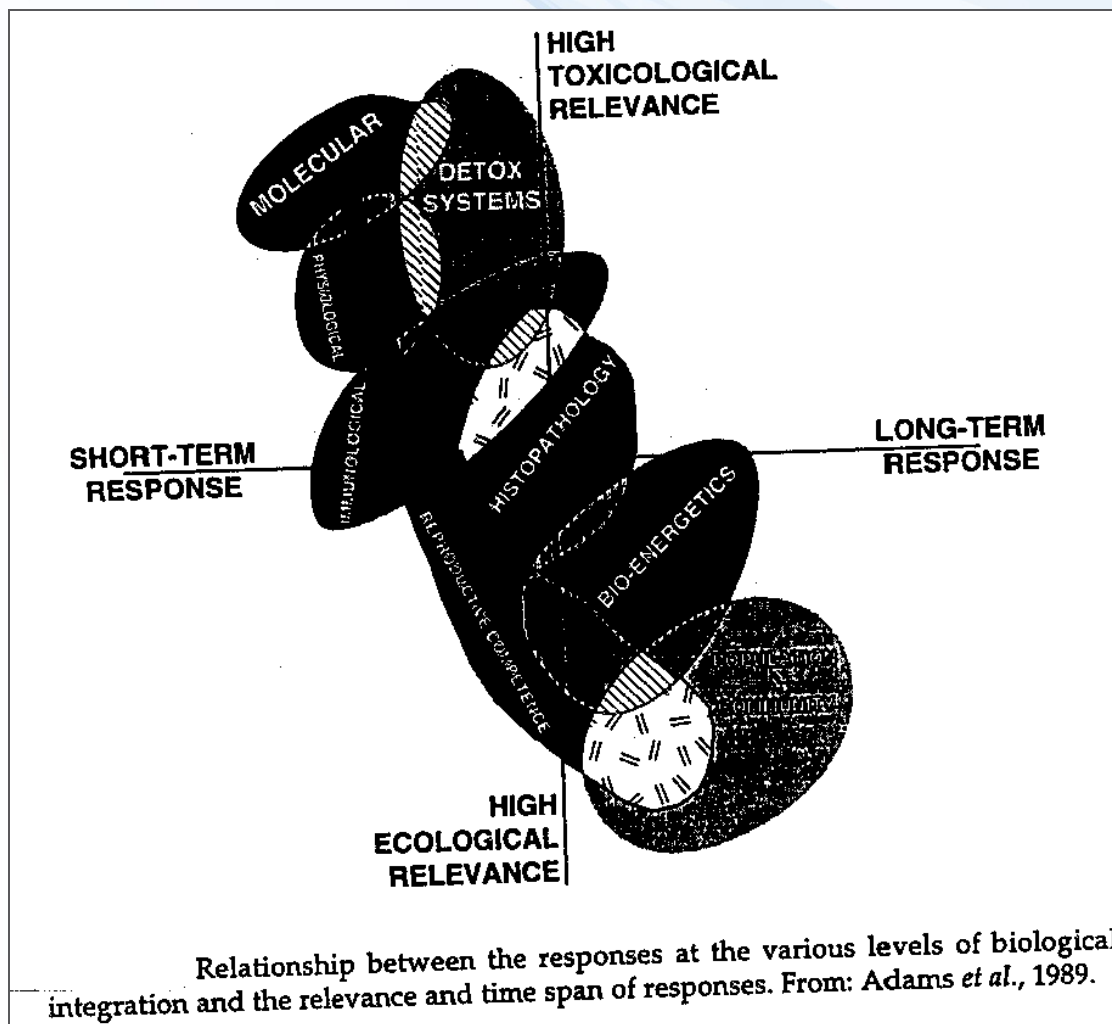
- resistantní druhy mohou rychle využít mrtvé buňky citlivějších druhů jako substrát, což může fungovat jako stimulace
- z toho také vyplývá, že **účinek znečištění závisí na historii společenstva**
- relativně rychlá selekce může ovlivňovat výsledky toxikologických testů

Příklad: Abundance bakterií v různých sedimentech 1 měsíc po olejové havárii *Amoco Cadiz*

	Total number of bacteria (10³/g sediment)	Hydrocarbon utilizing bacteria (10³/g sediment)
Oiled sites		
Salt march	630 000	14 000
Estuary - high intertidal	190 000	18
Estuary - low intertidal	690 000	390
Sandy beach	100 000	350
Reference sites		
Salt march	96 000	0,52
Beach	45 000	0,38



Koncepční přístupy – škála úrovní biologické integrace



Přístupy mikrobiální ekotoxikologie

Testy toxicity

Parametry typu
LCx, ECx, IDx

Standardizované
organismy

Standardizované
podmínky

×

Bioindikace

Retrospektivní údaj o
kontaminaci a poškození
vybraných druhů
(populací)

Neznáme historii

Nekontrolované faktory

Reálná společenstva
mikroorganismů

Environmentální směsi
stresorů

účelnost

?

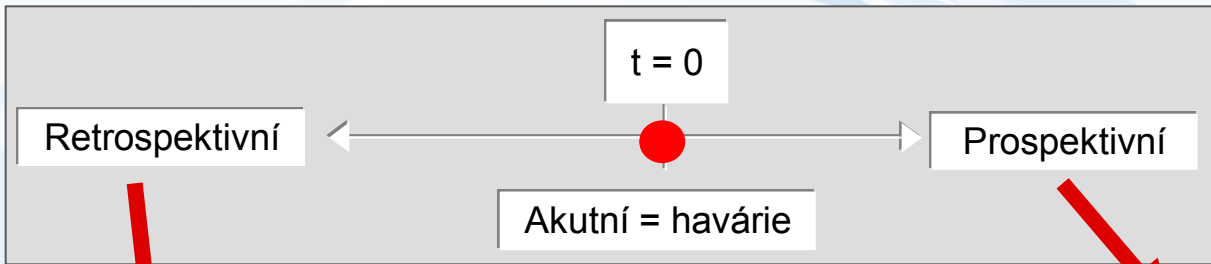
interpretace

Každý metodický přístup má svá omezení a může být interpretován pouze s ohledem na svůj informační obsah a zaměření



Přístupy ekotoxikologie MO

Přístup k hodnocení ekologických účinků:



“Klasika”:

- vím co je stresor (komplex stresorů)
- od jednoduchého ke složitému dle:

- hledáme kauzalitu
- propojení mezi účinky a stresory
- může dojít k prohození fází EcoRA

		Zasažený biologický systém		
		Organismus (1 druh) [1]	Společenstvo (ekosystém) [2]	Krajina (region) [3]
Kontaminant	Jeden faktor [1]	11	12	13
	Definovaná směs (kombinace) [2]	21	22	23
	Neurčitá kombinace [3]	31	32	33

Roste neurčitost, složitost a náklady

Klesá možnost exaktních testů

Narůstá nutnost expertních posudků



Terénní studie - mikroorganismy jako bioindikátory

- jsou velmi smysluplné vzhledem k zapojení v cyklech živin a v biotransformacích a biodegradacích
- jsou velmi pragmatické díky existenci rychlých a jednoduchých testů
- umožňují dobré modelování a extrapolace na vyšší organismy a jiné chemické látky
- jsou podstatné z hlediska celého ekosystému - stojí na nižších trofických úrovních a fungují jako „early warning“
- jsou moderní, neboť využívají nejnovější metody (molekulární techniky apod.)

Testy (eko)toxicity s MO

BIOTA
mikroorganismus(y)

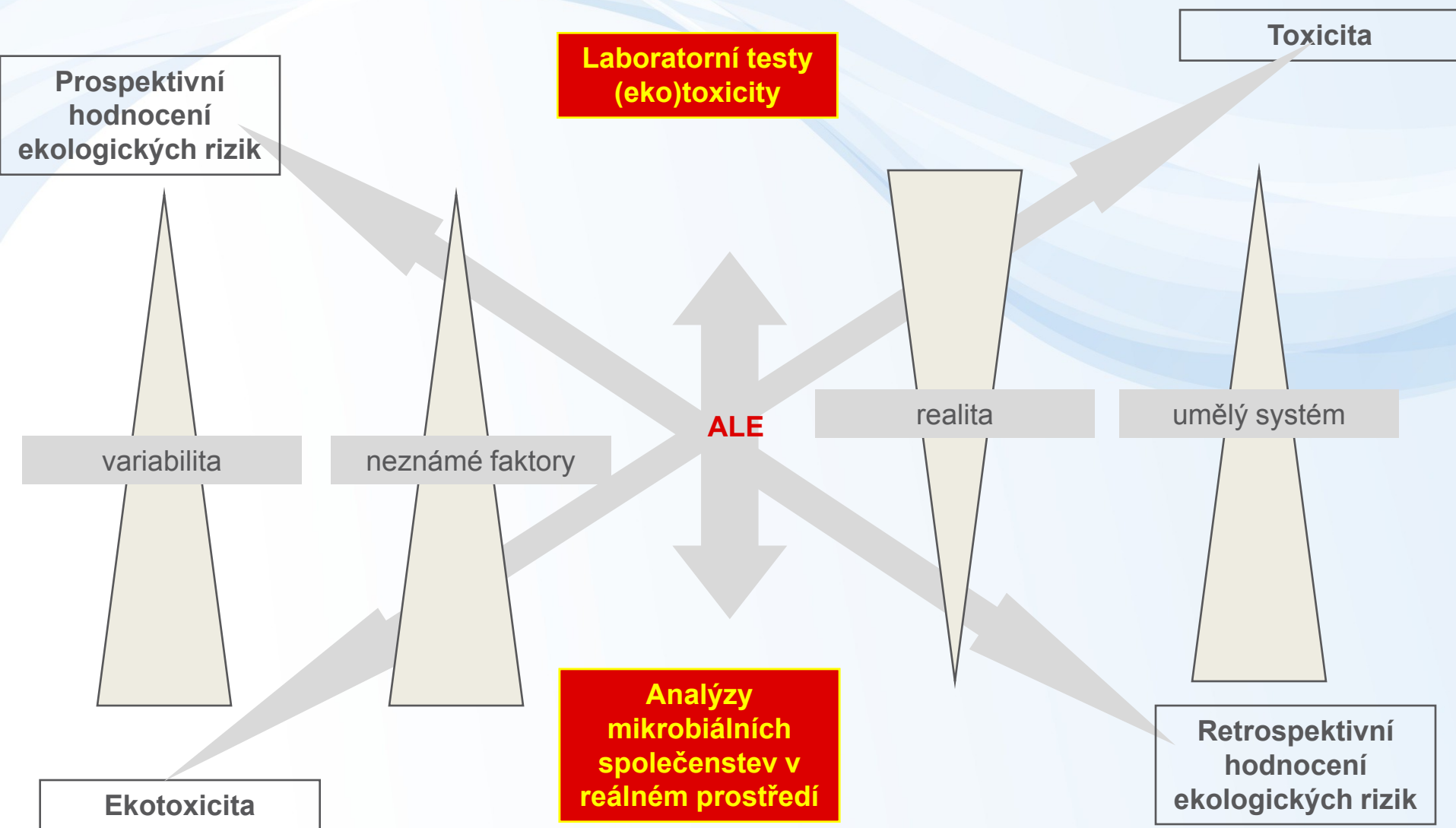
+

KONTAMINANT
→ čistá látka(y)
→ vzorek z ŽP



- testy jsou prováděny v adekvátní ředící řadě
- biologický materiál jen ve stejné kvalitě
- standardní podmínky testu
- výstupy NOEC, LOEC, LC₅₀, EC₅₀, IC₅₀ ...

Přístupy k ME výzkumu vs hodnocení ER



ZÁVĚR

**nutnost optimálního kompromisu
mezi laboratorními testy a terénními
studiemi**

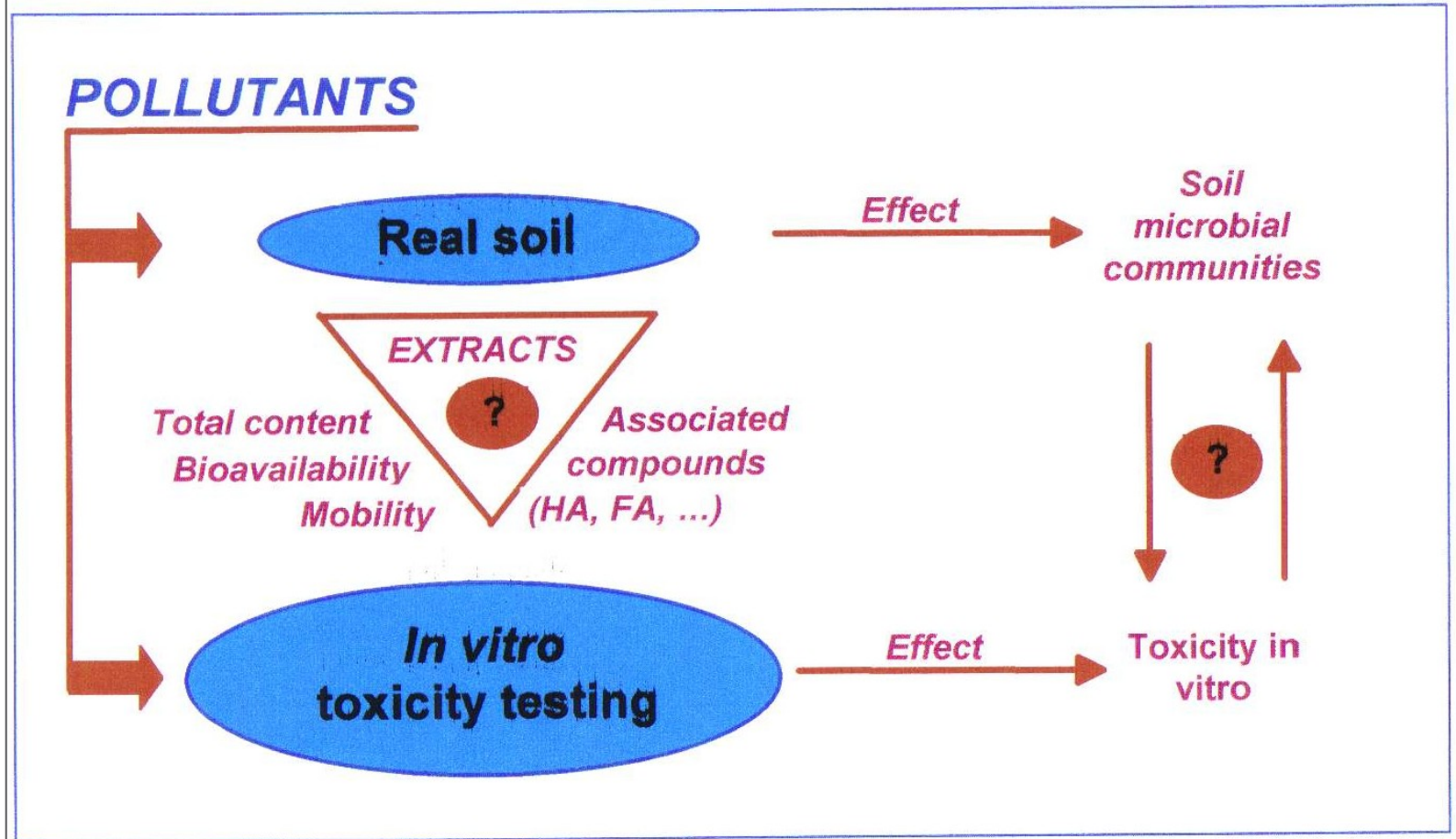
NAVÍC:

možnost oba přístupy kombinovat!



Ekotox. MO umožňuje kombinace přístupů

MOTTO: Reliable risk assessment focused on real soil environment requires combination of different approaches



Test No. 201: Alga, Growth Inhibition Test	11 July 2006
Test No. 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)	23 July 2010
Test No. 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria	25 Jan 2007
Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test	21 Jan 2000
Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test	21 Jan 2000

Standardy biotestů - ISO

Vodní mikroorganismy

ISO 10712:1995	Water quality -- Pseudomonas putida growth inhibition test (Pseudomonas cell multiplication inhibition test)
ISO 11348-1:2007	Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) -- Part 1: Method using freshly prepared bacteria
ISO 11348-2:2007	Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) -- Part 2: Method using liquid-dried bacteria
ISO 11348-3:2007	Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria
ISO 13641-1:2003	Water quality -- Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria -- Part 1: General test
ISO 13641-2:2003	Water quality -- Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria -- Part 2: Test for low biomass concentrations
ISO 13829:2000	Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test
ISO 16240:2005	Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water -- Salmonella/microsome test (Ames test)
ISO/DIS 11350	Water quality -- Determination of the genotoxicity of water and waste water -- Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)
ISO 15522:1999	Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water constituents on the growth of activated sludge microorganisms
ISO 21338:2010	Water quality -- Kinetic determination of the inhibitory effects of sediment, other solids and coloured samples on the light emission of Vibrio fischeri (kinetic luminescent bacteria test)
ISO 8192:2007	Water quality -- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation
ISO 9509:2006	Water quality -- Toxicity test for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge microorganisms

Standardy biotestů - ISO

Biodegradabilita ve vodě

ISO 10634:1995	Water quality -- Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium
ISO 10707:1994	Water quality -- Evaluation in an aqueous medium of the "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds -- Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test)
ISO 10708:1997	Water quality -- Evaluation in an aqueous medium of the ultimate aerobic biodegradability of organic compounds -- Determination of biochemical oxygen demand in a two-phase closed bottle test
ISO 11733:2004	Water quality -- Determination of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium -- Activated sludge simulation test
ISO 11734:1995	Water quality -- Evaluation of the "ultimate" anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge -- Method by measurement of the biogas production
ISO 14592-1:2002	Water quality -- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations -- Part 1: Shake-flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions
ISO 14592-2:2002	Water quality -- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations -- Part 2: Continuous flow river model with attached biomass
ISO 14593:1999	Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium -- Method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO ₂ headspace test)
ISO 16221:2001	Water quality -- Guidance for determination of biodegradability in the marine environment
ISO 18749:2004	Water quality -- Adsorption of substances on activated sludge -- Batch test using specific analytical methods
ISO 7827:2010	Water quality -- Evaluation of the "ready", "ultimate" aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium -- Method by analysis of dissolved organic carbon (DOC)
ISO 9408:1999	Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium by determination of oxygen demand in a closed respirometer
ISO 9439:1999	Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium -- Carbon dioxide evolution test
ISO 9887:1992	Water quality -- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium -- Semi-continuous activated sludge method (SCAS)
ISO 9888:1999	Water quality -- Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium -- Static test (Zahn-Wellens method)
ISO/TR 15462:2006	Water quality -- Selection of tests for biodegradability

Standardy biotestů - ISO

Půdní mikroorganismy

ISO 10381-6:2009	Soil quality -- Sampling -- Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil under aerobic conditions for the assessment of microbiological processes, biomass and diversity in the laboratory
ISO 14240-1:1997	Soil quality -- Determination of soil microbial biomass -- Part 1: Substrate-induced respiration method
ISO 14240-2:1997	Soil quality -- Determination of soil microbial biomass -- Part 2: Fumigation-extraction method
ISO 16072:2002	Soil quality -- Laboratory methods for determination of microbial soil respiration
ISO 17155:2002	Soil quality -- Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves
ISO 15685:2004	Soil quality -- Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification -- Rapid test by ammonium oxidation
ISO 14238:1997	Soil quality -- Biological methods -- Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes
ISO 23753-1:2005	Soil quality -- Determination of dehydrogenase activity in soils -- Part 1: Method using triphenyltetrazolium chloride (TTC)
ISO 23753-2:2005	Soil quality -- Determination of dehydrogenase activity in soils -- Part 2: Method using iodotetrazolium chloride (INT)
ISO/DIS 11063	Soil quality -- Method to directly extract DNA from soil samples
ISO/TS 29843-1:2010	Soil quality -- Determination of soil microbial diversity -- Part 1: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) and phospholipid ether lipids (PLEL) analysis
ISO/PRF TS 29843-2	Soil quality -- Determination of soil microbial diversity -- Part 2: Method by phospholipid fatty acid analysis (PLFA) using the simple PLFA extraction method
ISO/TS 10832:2009	Soil quality -- Effects of pollutants on mycorrhizal fungi -- Spore germination test
ISO/TS 22939:2010	Soil quality -- Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates
ISO 11266:1994	Soil quality -- Guidance on laboratory testing for biodegradation of organic chemicals in soil under aerobic conditions
ISO 15473:2002	Soil quality -- Guidance on laboratory testing for biodegradation of organic chemicals in soil under anaerobic conditions
ISO 14239:1997	Soil quality -- Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions

Standardy biotestů - ČSN



ČSN EN ISO 10253	Jakost vod - Zkouška inhibice růstu mořských řas <i>Skeletonema costatum</i> a <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
ČSN EN ISO 11348-2	Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i> (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 2: Metoda se sušenými bakteriemi
ČSN EN ISO 11348-3	Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i> (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi
ČSN EN ISO 11348-3	Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi <i>Vibrio fischeri</i> (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi
ČSN EN ISO 8692	Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas
ČSN EN ISO 9509	Jakost vod - Zkouška toxicity pro hodnocení inhibice nitrifikace mikroorganismy aktivovaného kalu
ČSN EN ISO 8192	Jakost vod - Zkouška inhibice spotřeby kyslíku aktivovaným kalem při oxidaci uhlíkatých látek a amoniakálního dusíku
ČSN 75 7717	Jakost vod - Stanovení planktonních sinic
ČSN EN 13946	Jakost vod - Návod pro rutinní odběr a úpravu vzorků bentických rozsivek z řek
ČSN EN 14407	Jakost vod - Návod pro identifikaci a kvantifikaci bentických rozsivek z vodních toků a pro interpretaci dat
ČSN EN 15204	Jakost vod - Návod pro počítání fytoplanktonu za použití inverzní mikroskopie (metoda podle Utermöhl)
ČSN EN ISO 11733	Jakost vod - Stanovení odstranitelnosti a biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí - Simulační zkouška s aktivovaným kalem
ČSN EN ISO 16266	Jakost vod - Stanovení <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Metoda membránových filtrů
ČSN EN ISO 9408	Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí stanovením spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru
ČSN EN ISO 9439	Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí - Metoda stanovení uvolněného oxidu uhličitého
ČSN ISO 14593	Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí - Metoda stanovení anorganického uhlíku v těsně uzavřených lahvičkách (CO ₂ headspace metoda)

Standardy US EPA

<http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/home/draftguidelines.htm>

Voda

[850.5400 - Algal Toxicity, Tiers I and II \(PDF\) \(11 pp, 42K\)](#)

[850.6800 - Modified Activated Sludge, Respiration Inhibition Test for Sparingly Soluble Chemicals \(PDF\) \(9 pp, 37K\)](#)

Půda

[850.4600 - Rhizobium-Legume Toxicity \(PDF\) \(14 pp, 73K\)](#)

[850.4800 - Plant Uptake and Translocation Test \(PDF\) \(13 pp, 35K\)](#)





Effects of Road Deicing Salts on Soil Microorganisms

- 3 místa v KRNAP intenzivní solení
- Sledován efekt na mikroorganismy

Table 1: Physical-chemical characteristics of the studied soils

Transect points	pH (H ₂ O)	C _{org} (%)	BS ^a (%)	CEC ^b (me/100g)	E.C. ^c (μS/cm)	Ex.Ac. ^d (me/100g)	Cd total extraction (mg/kg)	Zn total extraction (mg/kg)	water extraction (mg/kg _{dw})				0,1 M BaCl ₂ extraction (mg/kg _{dw})			
									Ca ²⁺	Na ⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	Ca	K	Mg	Na
A control	3.78	12.00	21.4	10.5	71	8.24	0.35	49.9	31	11.9	10.1	41	331	53.1	46	17.2
A 1 m	7.63*	4.52*	99.3*	19.0*	64	0.14*	0.35	201.0*	18*	74.3*	4.7*	15*	2910*	76.8	379*	239.0*
A 10 m	5.00	11.90	94.5*	20.8*	62	1.14*	0.82*	108.0*	32	20.3	18.3*	35	3160*	180.0*	400*	40.0
A 30 m	4.10	22.50*	61.4*	21.4*	119*	8.25	1.08*	72.2*	32	20.2	-	74*	2000*	190.0*	303*	44.0
B control	3.89	5.57	13.6	9.4	55	8.15	0.35	65.7	22	5.3	4.2	43	152	65.8	40	6.8
B 1 m	7.70*	7.35	99.4*	18.9*	96*	0.11*	0.35	160.0*	12*	104.0*	4.2	27*	2380*	139.0*	297*	951.0*
B 10 m	5.50*	10.80*	92.5*	17.3*	104*	1.29*	0.35	90.2*	20	97.0*	20.0*	58*	2210*	125.0*	262*	577.0*
B 30 m	3.97	20.80*	63.2*	15.0*	68	5.52*	0.79*	42.6*	23	7.8	16.7*	28*	1560*	62.7	180*	17.3
C control	3.94	9.83	10.8	9.5	49	8.51	0.35	14.8	17	8.0	14.5	50	138	33.4	25	11.4
C 1 m	8.13*	4.43*	99.2*	12.6*	85*	0.10*	0.35	59.7*	8*	102.0*	3.5*	15*	1220*	25.2	152*	1180.0*
C 10 m	4.33	4.64*	17.6	5.6*	43	4.58*	0.35	10.5	12*	23.3*	20.0	15*	94	61.6*	24	35.8
C 30 m	4.72	5.64*	42.6*	6.2*	93*	3.54*	0.35	19.4	14	59.0*	73.0*	39*	339	22.8	50	107.0

^aBase saturation, ^bcation exchange capacity, ^celectric conductivity at 25 °C, ^dexchangeable acidity.

Asterisk marks statistically significant difference (p<0.05) from the control point of each transect.

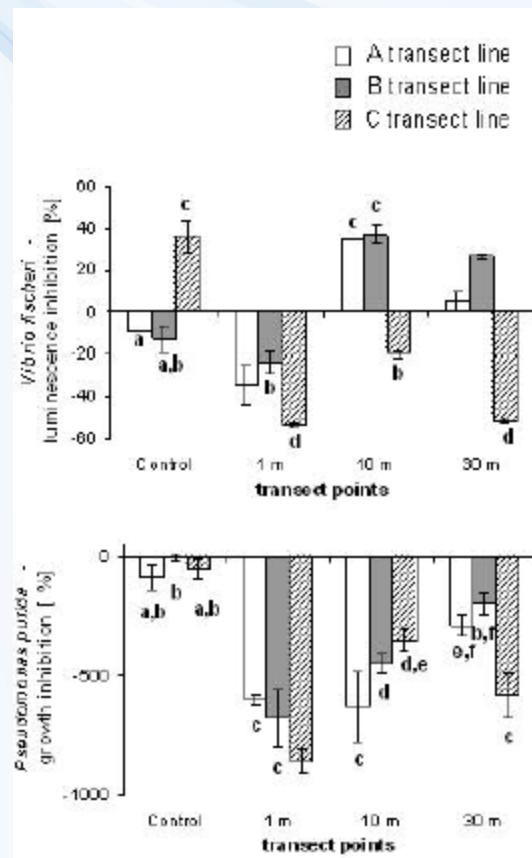
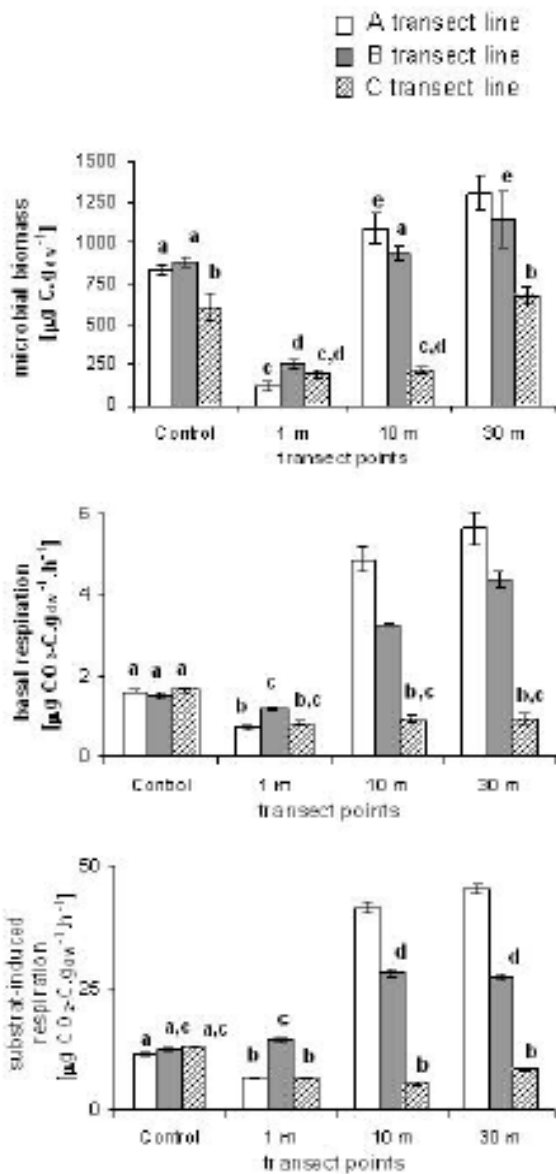


Effects of Road Deicing Salts on Soil Microorganisms

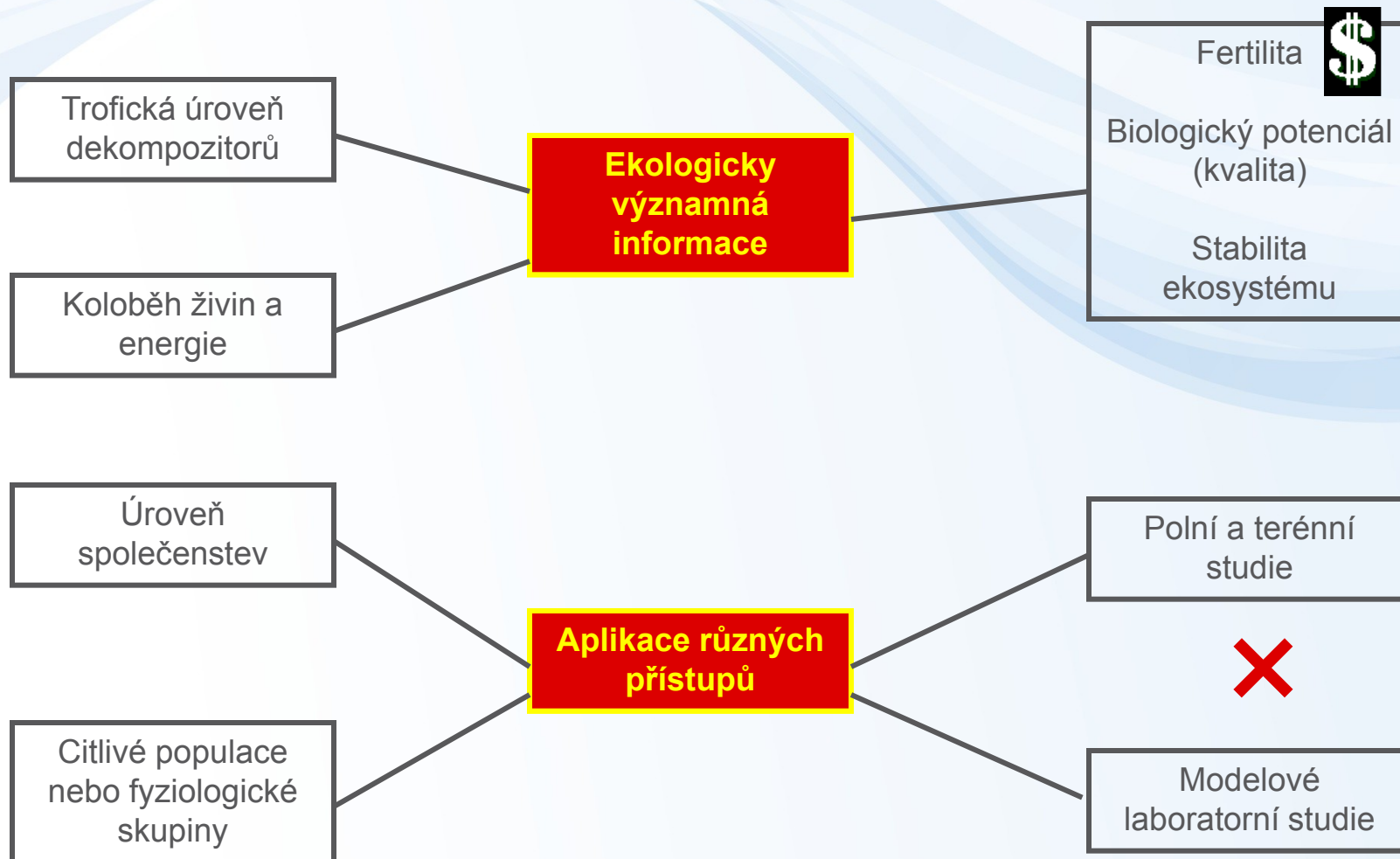
Reálné společenstvo mikroorganismů

Testy toxicity s bakteriemi

versus



Proč ME v hodnocení ekologických rizik ?



Proč ME v hodnocení ekologických rizik ?

