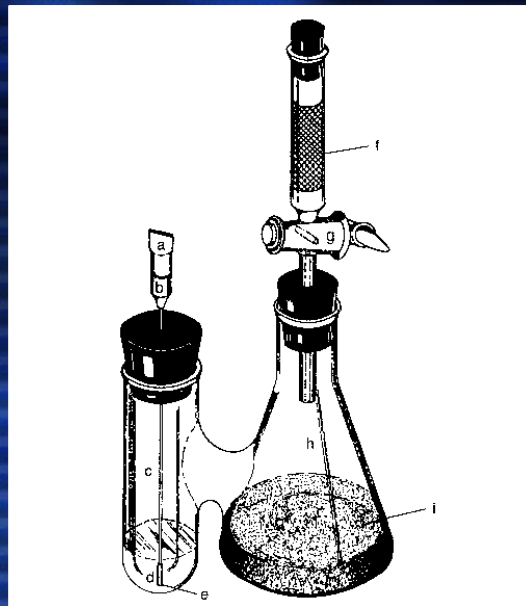


Měření aktivit mikroorganismů



Aktivity mikroorganismů

- mají velmi úzký vztah k funkcím v ekosystému

Z hlediska bioindikace:

- jsou smysluplným a zcela nezbytným doplněním údajů o kvantitě mikroorganismů - nestačí jen vysoké množství mikroorganismů, ale hlavně aby byly funkční, tedy aktivní; co se týká aktivity, je důležitá nejen její úroveň, ale i mnohostranost, diverzita metabolických funkcí; bohužel, téměř vždy (s výjimkou in situ technik) dochází ke zkreslení při přenosu z reálného ekosystému

Z hlediska ekotoxicity:

- inhibice či aktivace biochemických pochodů pod vlivem látek a stresových faktorů - řada standardizovaných testů

Příklady:

- měření ATP
- produkce tepla
- měření respirace
- měření mineralizace dusíku
- měření fixace dusíku
- měření nitrifikace, sulfurikace, oxidace železa apod.
- měření denitrifikace, desulfurikace
- měření enzymových aktivit
- atd. atd.

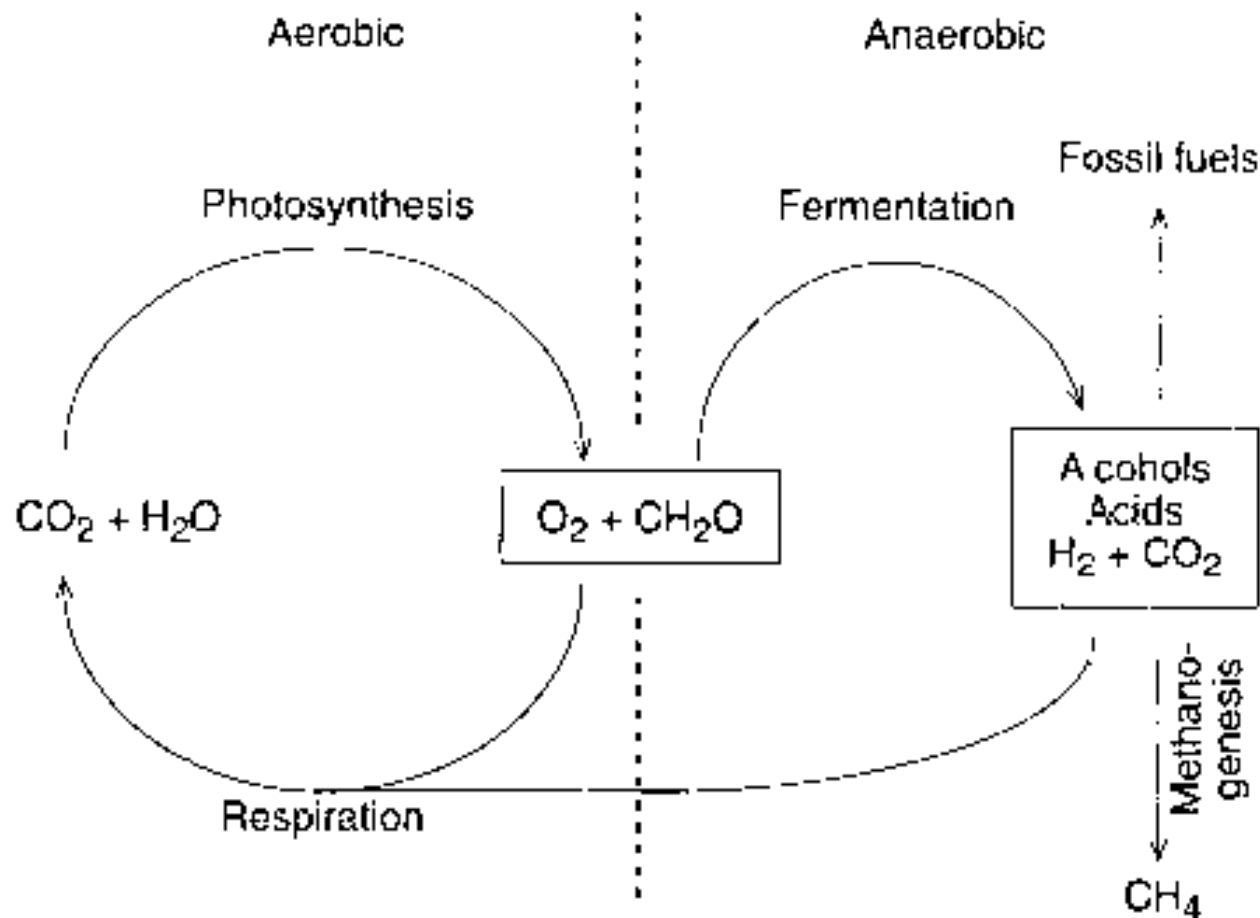
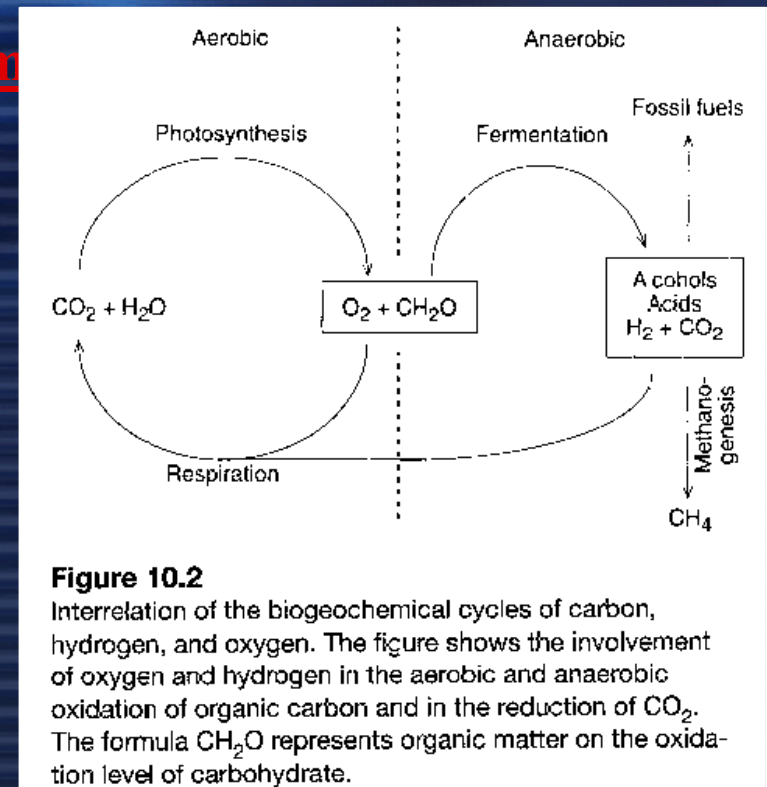


Figure 10.2

Interrelation of the biogeochemical cycles of carbon, hydrogen, and oxygen. The figure shows the involvement of oxygen and hydrogen in the aerobic and anaerobic oxidation of organic carbon and in the reduction of CO_2 . The formula CH_2O represents organic matter on the oxidation level of carbohydrate.

Aktivity mikroorganismů $\left\langle \right\rangle$ biochemie

- neustálý cyklus je nejobjemnější zejména u C, O, H, N, P, S, Fe
- cykly C, O a H jsou velmi těsně svázány $\text{-----}\rightarrow$
- mikroorganismy hrají v těchto cyklech stěžejní role: jsou jednak zdrojem ("poolem") těchto prvků (viz. mikrobiální biomasa) a jednak "propadem", tj. mají nezastupitelnou roli v dekompoziční části cyklů
- aktivita mikroorganismů určuje potenciální produktivitu celého ekosystému; vztah k producentům
- někdy je účastné celé společenstvo, jindy je důležitá jen malá specializovaná populace
- mikroorganismy jsou specialisté např. při biodegradacích "obtížných" polymerů a substrátů (lignin, celulóza) a při anaerobních degradacích



Změny těchto aktivit (např. vlivem člověka) \implies negativní vliv na celý ekosystém

Aktivita mikroorganismů < =====> biochemické cykly v ekosystémech

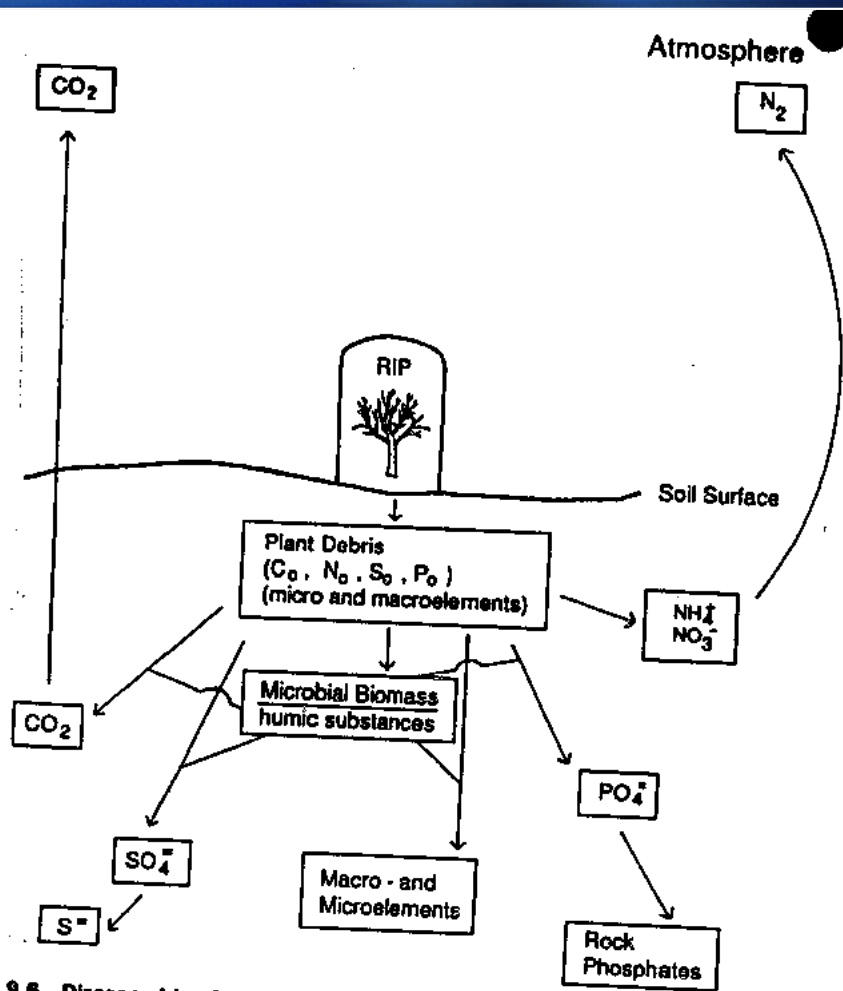


Fig. 9.6 Disassembly of plant organic matter into various primary inorganic nutrient pools. (The subscript *o* refers to various organic pools of the individual element.)

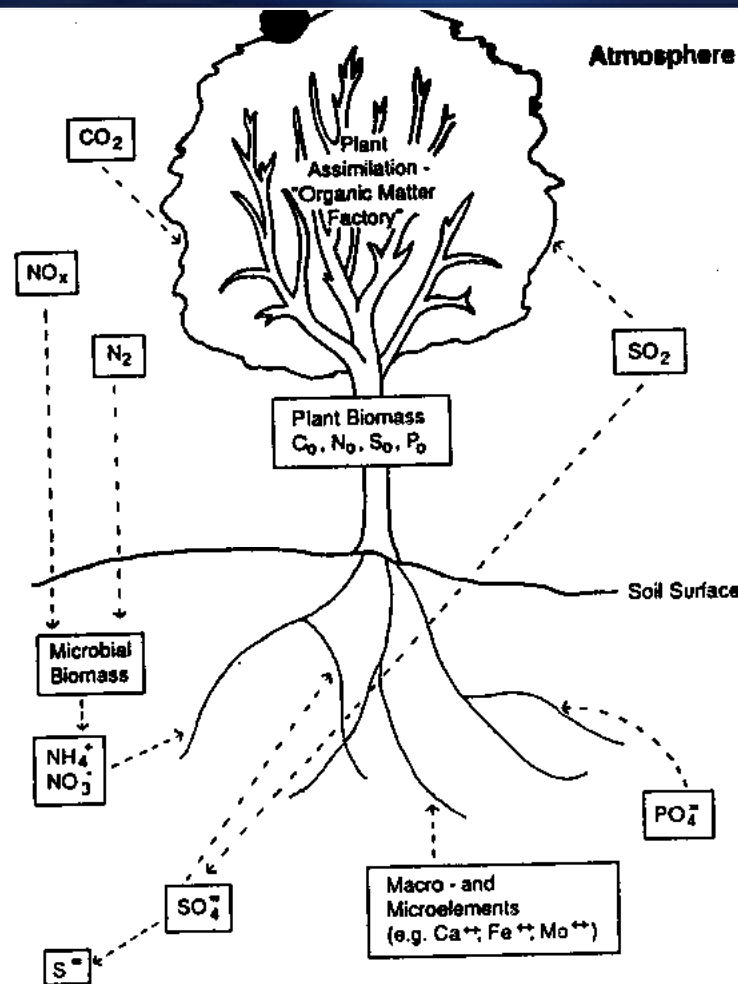
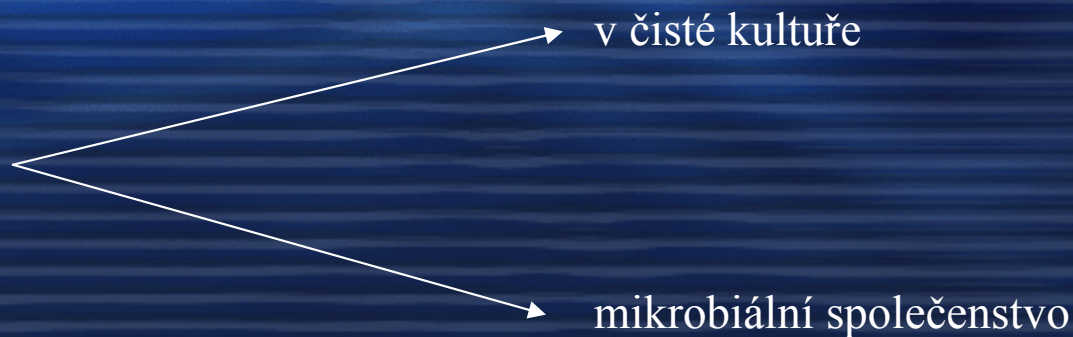


Fig. 9.5 Examples of the central role of plant biomass in sequestering various nutrient elements. (The subscript *o* refers to various organic pools of the individual element.)

Aktivity mikroorganismů - biochemický princip - modely



- obecně lze aplikovat kinetiku Michaelis - Mentenové:

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

Příklad:

- přidáváme ^{14}C -acetát a sledujeme rychlost produkce "produktu" v tomto případě suma vyrespirovaného a inkorporovaného ^{14}C

- v_{\max} je pak tzv. heterotrofický potenciál in situ, protože aktuální rychlost je modifikována transportem vzorku a manipulacemi => možnost obejít komplikace s tímto zkrácením

Lze využít značených látek:

- umožňují odlišit metabolismus katabolický a anabolický; jsou ideální měrou růstu
- ^{14}C a ^{15}N se užívají pro mineralizace
- $^{14}\text{CO}_2$ se užívá pro sledování autotrofů
- ^3H adenin se užívá jako obraz reprodukce DNA a RNA bakterií a jednobuněčných řas
- methyl ^3H thymidin se užívá jako obraz reprodukce bakteriální DNA
- ^3H leucin - inkorporace do bakteriálních proteinů

1) Procesy spojené s biochemickým cyklem uhlíku

- souvisí velmi úzce s potravními sítěmi
- patří sem i různé "speciality" např.:

Methanogenese

- striktně anaerobní
- CO_2 je akceptor elektronů \implies methan
- vodík pochází z fermentačního procesu
- zdroj uhlíku je CO_2 ale nemají Calvinův cyklus, využívají acetyl-CoA syntázu
- význam pro skleníkový efekt
- časté studie methanogenních bakterií v rýžových polích

Acetogenese

- $\text{CO}_2 + \text{vodík} \implies \text{acetát místo methanu}$
- méně energeticky výhodné než methanogenese

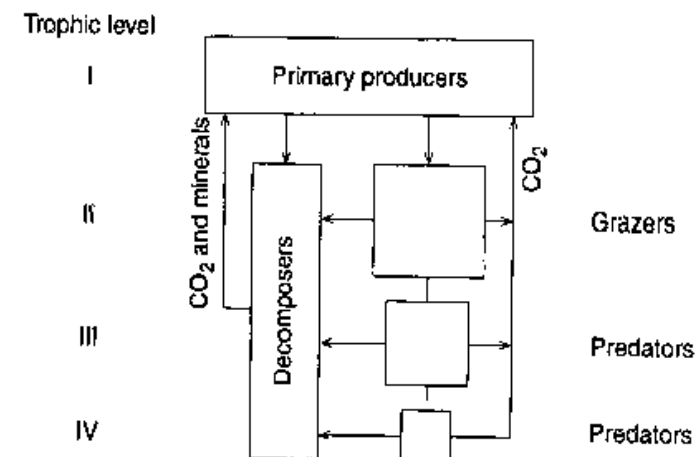


Figure 10.3

An idealized food web showing transfers between trophic levels. Organic carbon formed by primary producers is transferred to grazers and predators. Decomposers and respiration of grazers and predators return CO_2 to primary producers. The diagram shows that the supportable biomass declines at progressively higher trophic levels.

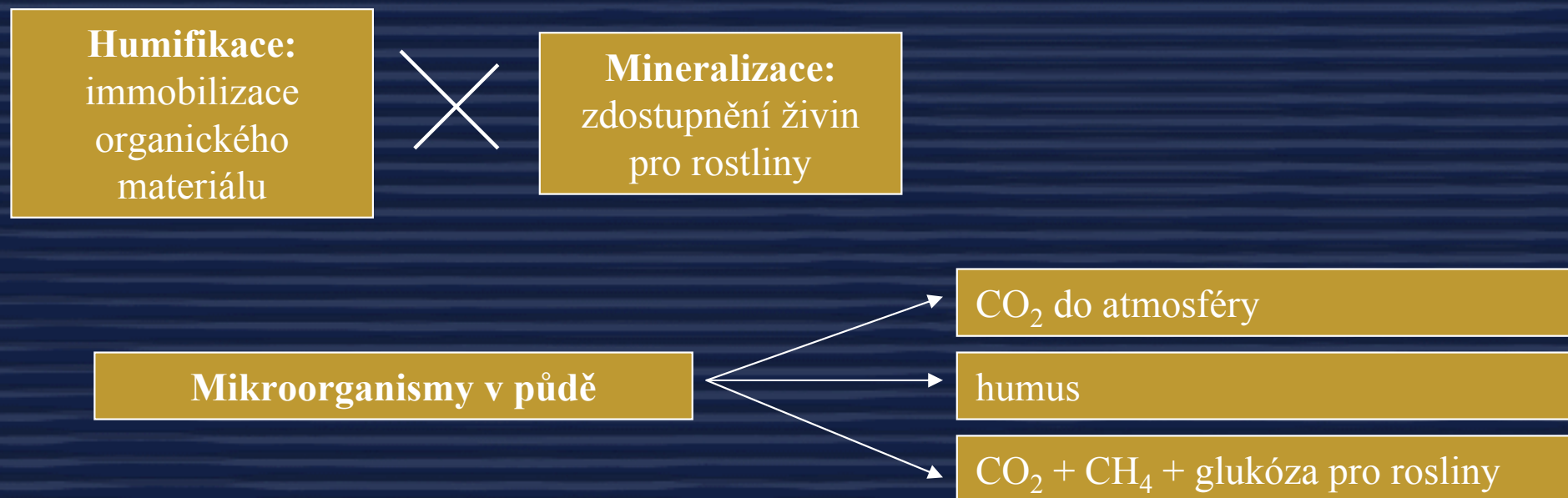
Hlavní částí dekompoziční části biochemických cyklů je však mineralizace uhlíku (organických látek)

Mineralizace uhlíku



- respirace - reflektuje mikrobiální metabolismus organických substrátů přítomných v prostředí Častá závislost na řadě faktorů prostředí
- není jen věcí mikroorganismů - i kořeny a mezofauna v půdě respirují
- je limitována pH (např. v rašelinách, sedimentech, histosolech), koncentrací kyslíku (BOD) - pokud je snížena, dochází k akumulaci organického materiálu
- v půdě je funkcí vlhkosti, teploty, půdní struktury, redoxpotenciálu a dostupného substrátu

Vztah s tvorbou humusu? = mezistupeň mezi totální mineralizací a žádnou degradací

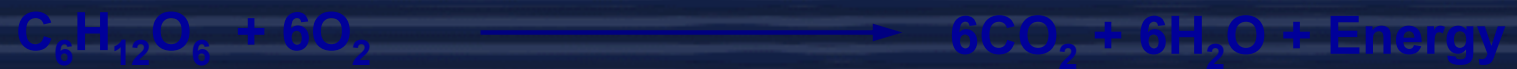


Respirace

Anaerobní:



Aerobní:

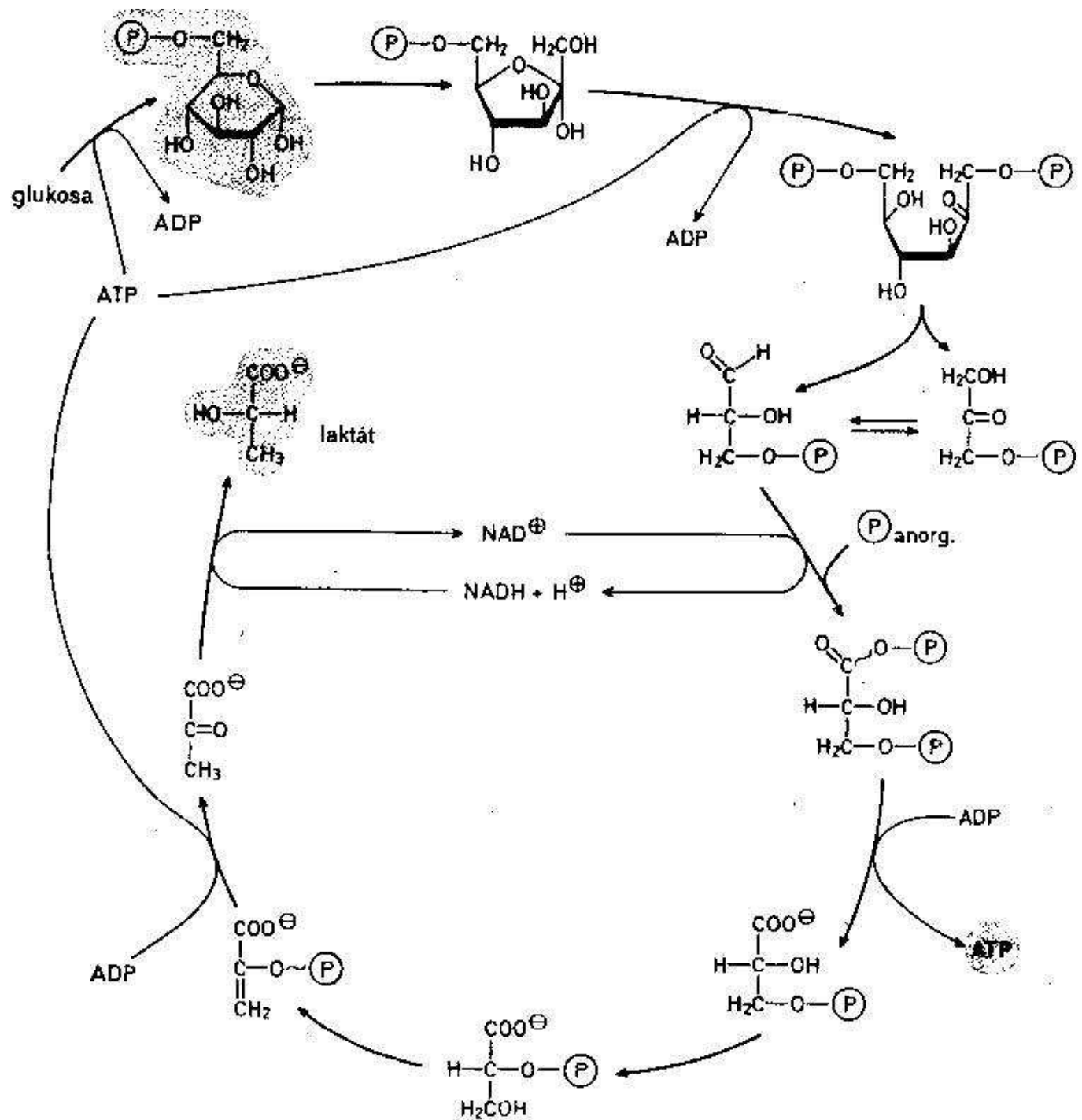


Glykolýza

- je starší a primitivní
- probíhá v cytoplazmě
- výtěžek z jedné molekuly glukózy pouze 2 ATP

Kvašení:

- alkoholové
- mléčné
- propionové
- máselné
- atd.



Obr. 15-3. Schéma anaerobní glykolýsy. Počíná reakcí katalyzovanou aldoláza je znázorněno odbourávání pouze jedné molekuly triosy.

Aerobní fosforylace

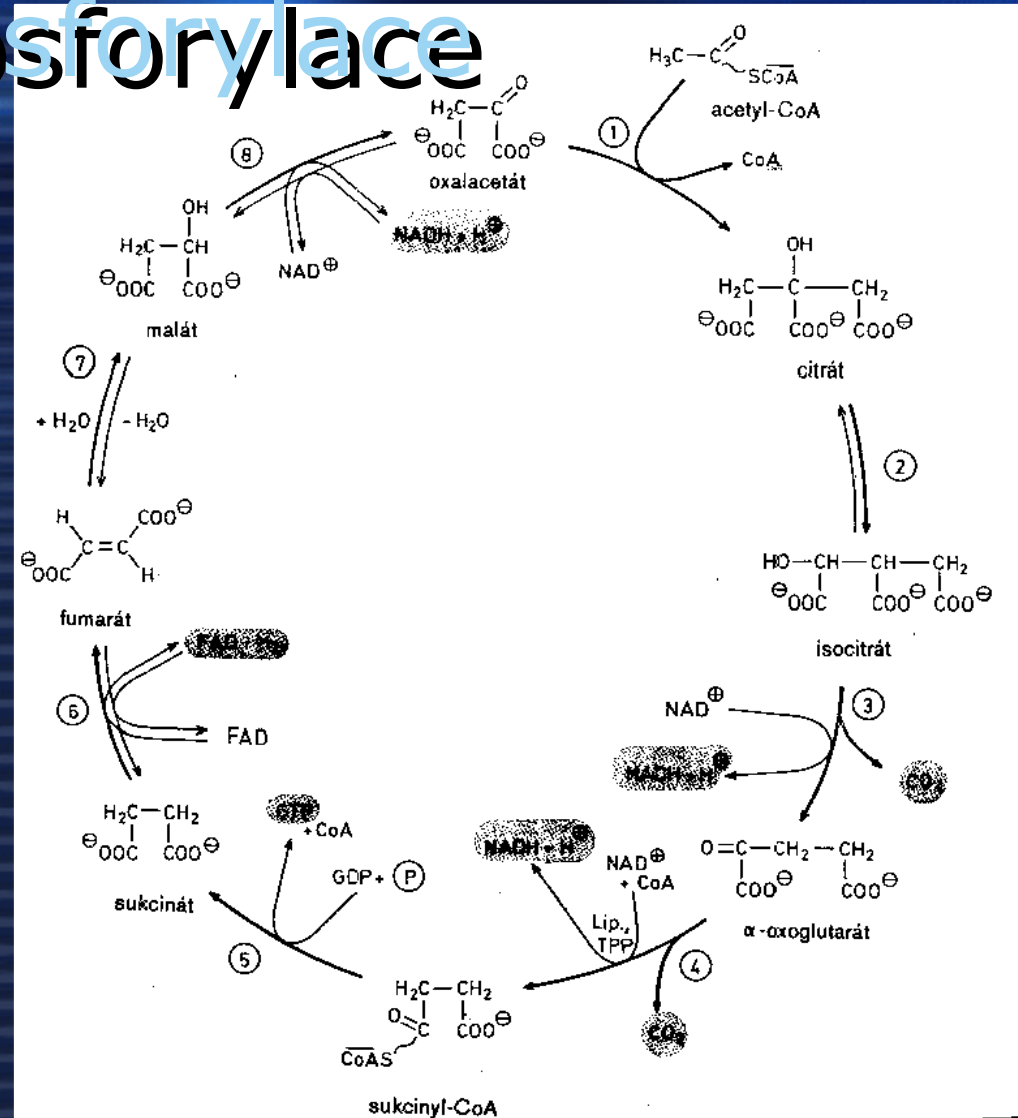
Celkem z jedné molekuly glukózy 38 ATP - tj. 19× účinnější než glykolýza

I to je ale „jen“ 50% energie skryté ve vazbách, zbytek se uvolní jako teplo

AEROBNÍ FOSFORYLACE

3 propojené systémy:

- Krebsův cyklus
- systém elektronového transportu
- systém aktivující kyslík

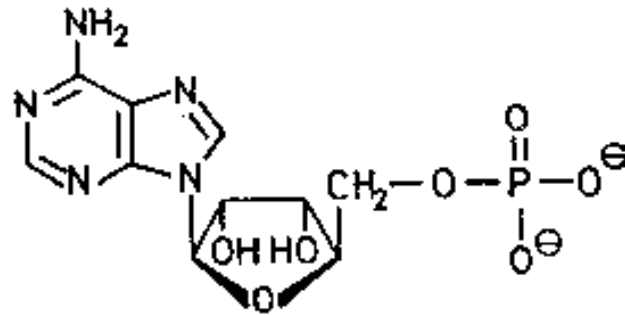


ve stupni 3, 4 a 8 oxidací NADH po 3, dohromady	9ATP
ve stupni 6 oxidací flavinu	2ATP
ve stupni 5 přenosem makroergické vazby	1ATP
celkem	12ATP

Respirace - typy

Typ respirace	Redukční reakce Akceptor elektronů ⇒ produkt	Oxidační reakce Donor elektronů ⇒ produkt
Aerobic	$O_2 \Rightarrow H_2O$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Denitrification	$NO_3^- \Rightarrow N_2$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Mn reduction	$Mn^{4+} \Rightarrow Mn^{2+}$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Nitrate reduction	$NO_3^- \Rightarrow NH_4^+$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Sulfate reduction	$SO_4^{2-} \Rightarrow HS^-, H_2S$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$
Methanogene sis	$CO_2 \Rightarrow CH_4$	$CH_2O \Rightarrow CO_2$

ATP



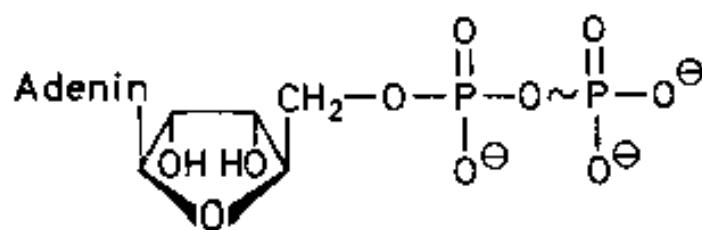
adenin

ribose

fosforečná kyselina

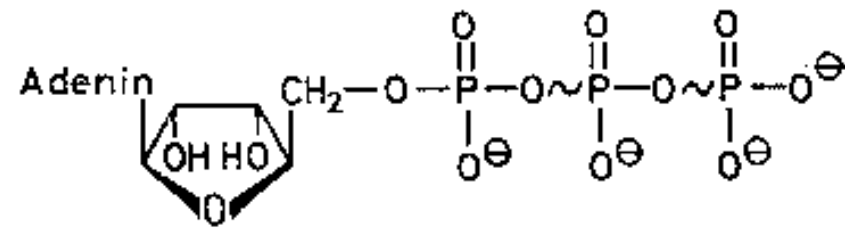
adenosin

adenosinmonofosfát
AMP



Ade—Rib—(P)~(P)

adenosindifosfát
ADP



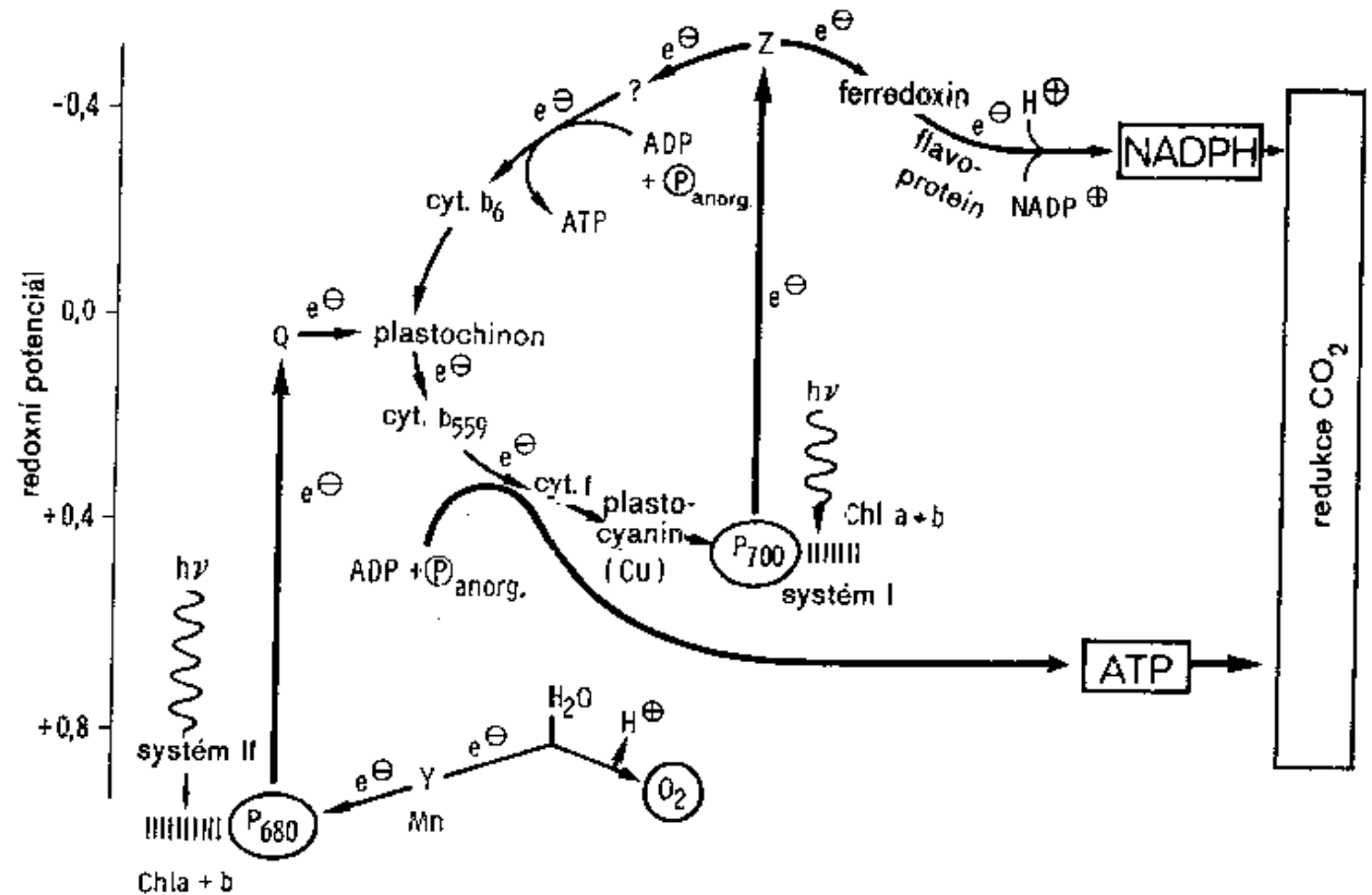
Ade—Rib—(P)~(P)~(P)

adenosintrifosfát
ATP

TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

Fotosyntéza

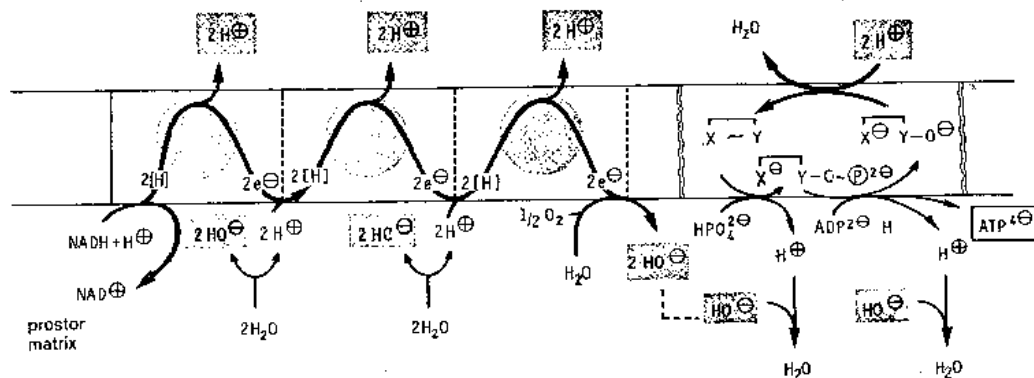
- původně byl donorem elektronů H_2S , později voda
- chemiosmotická teorie: podobnost přenosových systémů elektronů (viz. další fólie)



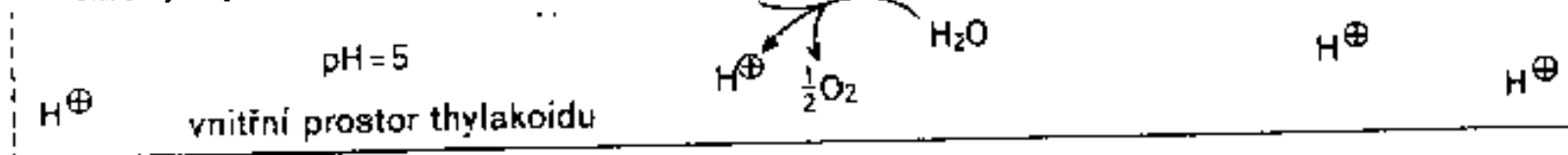
Obr. 16-2. Světelné reakce a redoxní systémy při fotosyntéze. Schéma má ukázat jenom pořadí redoxních enzymů bez ohledu na stechiometrii. Další výklad v textu.

TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

Fotosyntéza a (aerobní) respirace: systémy přenosu e^- a H^+



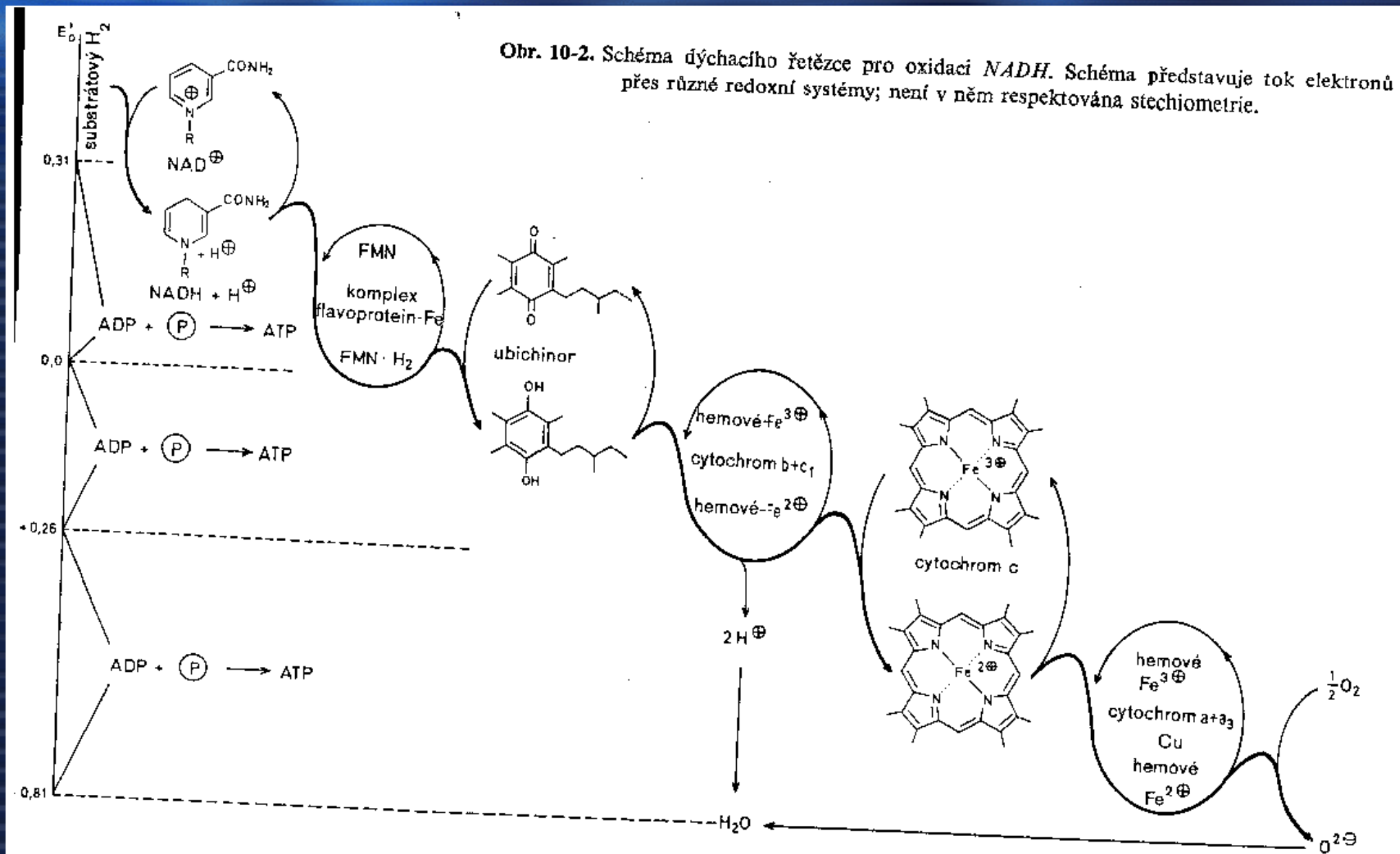
Obr. 10-4. Schéma chemiosmotické teorie spřažení. Redoxními systémy se na každé „smyčce“ odevzdávají dva protony ven do mezimembránového prostoru; hydroxylový ion zůstává uvnitř a zvyšuje hodnotu pH. Na místě spřažení (vpravo, znázorněno je jen jedno) se využije gradientu pH k tvorbě vazby $X \sim Y$ bohaté energií; přitom putují dva negativní náboje ven. Ve schématu vznikají tak, že z ADP a fosfátu se odštěpuje molekula vody; ionty H^+ slouží uvnitř k neutralisaci, kyslík převezme transport náboje na bílkovně. Formálně odpovídá reakce spřažení neutralizační reakci kyseliny zásadou.



Obr. 16-3. K chemiosmotické teorii při fotofosforylaci (podle H. T. WITTA, pozmeněno). Schéma znázorňuje stacionární stav při osvětlení. Během primárního procesu ve fotosystému I a II (viz diagonální šipky) se přenášejí elektrony ven z thylakoidů; váží se s H^+ a redukují plastoquinon (PQ) ev. $NADP^+$. Tím se ochuzuje vnější prostor o H^+ . Na vnitřní straně membrány se odnímají elektrony (e^-) z vody (systém II) ev. přes cytochromový řetězec z PQH ; ionty H^+ se předávají do vnitřního prostoru. Plastoquinon, který osciluje mezi chinonovým, semichinonovým a hydrochinonovým stupněm, funguje jako přenašeč H^+ . Gradient pH se vyrovnává otevřeným pórem naznačeným vpravo a pohání tak fosforylaci ADP na ATP obrácením funkce „iontové pumpy“ poháněné ATP .

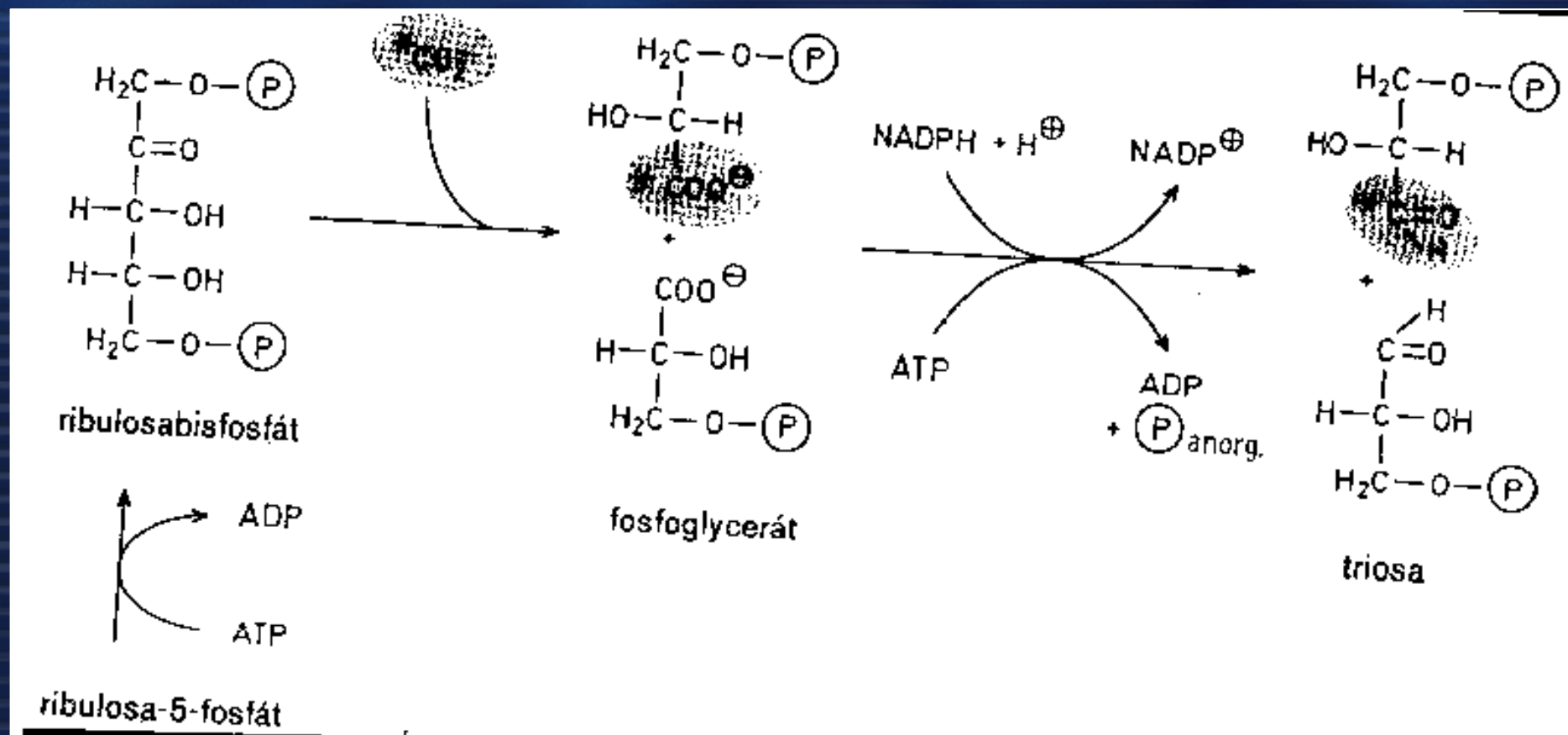
TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

(Aerobní) respirace: dýchací řetězec přenosu e^- a H^+



TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

Fixace CO₂ v Calvinově cyklu



Mineralizace uhlíku

Rozklad přirozených organických polymerů

- rozklad celulózy zastávají hlavně houby, ale i aerobní bakterie
- rozklad ligninu je mnohem složitější, podílejí se na něm houby

Mineralizace uhlíku

- jako bazální mineralizace (= bez přídavku substrátu) koreluje s obsahem organické hmoty (C_{org})
- ISO/DIS 16072 Soil quality -- Laboratory methods for determination of microbial soil respiration

Důležitý parametr pro biologickou kvalitu půdy - BR.

Limity a nevýhody:

- aktuální přídavek substrátu ovlivňuje podíl **aktivních** mikroorganismů
- relativní necitlivost k malým dávkám kontaminantů
- nutno kombinovat s jinými parametry (např. mikrobiál biomasa) či potenciální respirace
- nutno interpretovat s ohledem na obsah a dostupných organických látek v půdě
- u terénních měření nutno stanovovat opakovaně v čase

Respirace je klasický parametr, s výstupem např. EC_{50}

Příklad:

- vliv stříbra na bazální respiraci

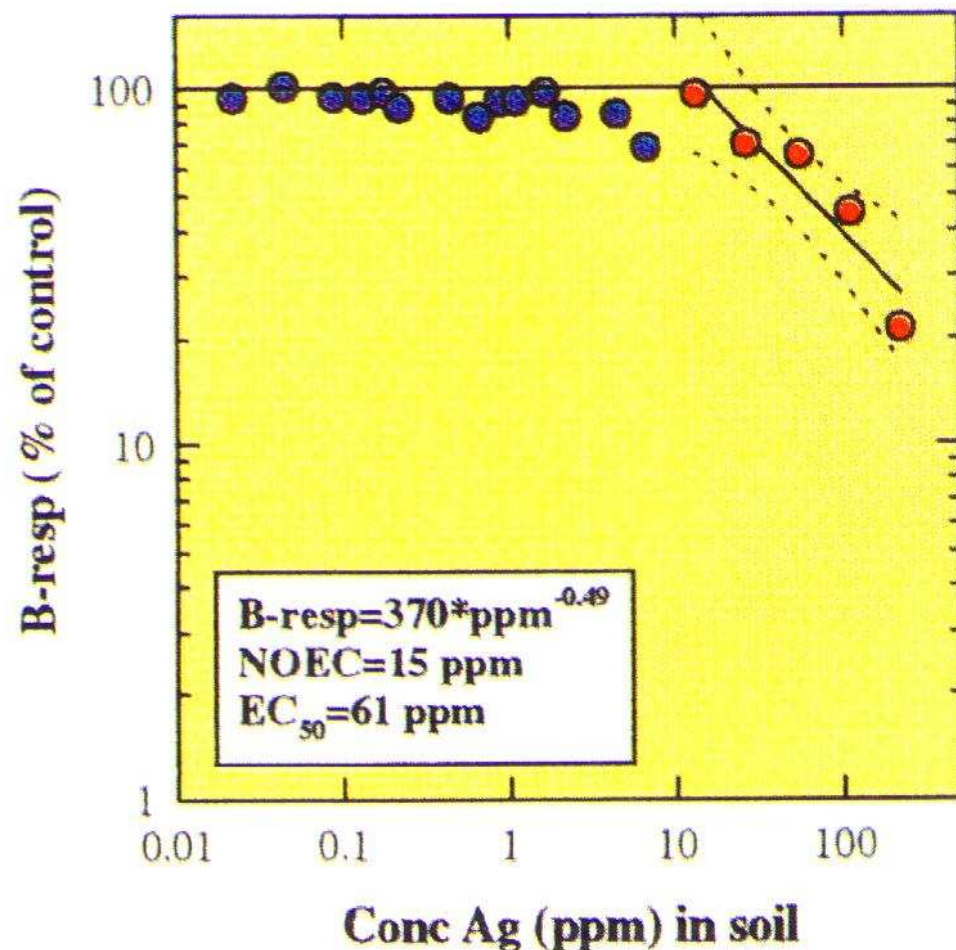


Figure 1. Effects of silver on basal respiration rate of soil microorganisms. Addition of silver was made 10 days before glucose addition. The NOEC- and EC_{50} -values were calculated from the equation in the Figure. Dotted line shows the 95% confidence interval.

Respirace je klasický parametr, s výstupem např. EC₅₀

Příklad:

- respirace ¹⁴C-acetátu u pěti mikroorganismů a jejich společenstva pod vlivem zinku
- nejcitlivější byla *Pseudomonas putida*

Poznámka:

substrátů jako je acetát se užívá, pokud chceme limitovat růst a zachytit pouze efekt na respirační aktivitu. Z tohoto důvodu se také přidává jen nízká koncentrace.

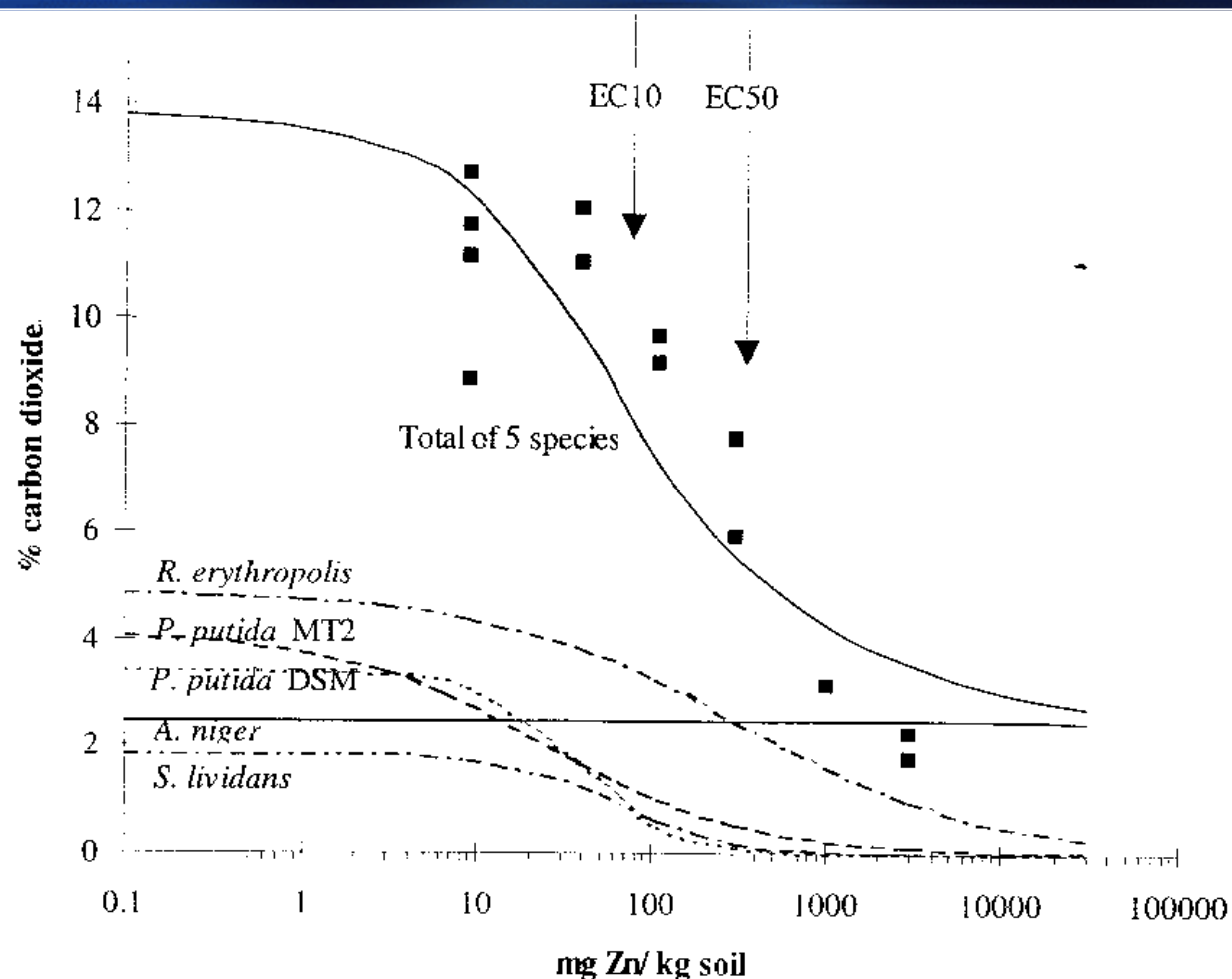


Figure 1. The toxic effect of zinc on the mineralization of [¹⁴C]acetate in a slurry of sterilized artificial soil amended with five strains of micro-organisms. The square data points show the experimental results whereas the curves show model calculations that were derived from single species toxicity tests. The curve marked "Total of 5 species" is the sum of the ¹⁴CO₂ production from the five individual strains derived from single species toxicity data.

Příklad:

- respirace ^{14}C -acetátu u pěti mikroorganismů a jejich společenstva pod vlivem PCP
- nejcitlivější byl *Aspergillus niger*
- z této studie vyplývá, že 10% inhibice procesuje způsobena více než 50% inhibicí sensitivních druhů
- z toho vyplývá, že absence významnějšího efektu na proces společný pro celé společenstvo mikroorganismů ještě nemusí garantovat, že žádný ze zahrnutých druhů nebyl ovlivněn!

• Hence, process protection is not sufficient for species protection

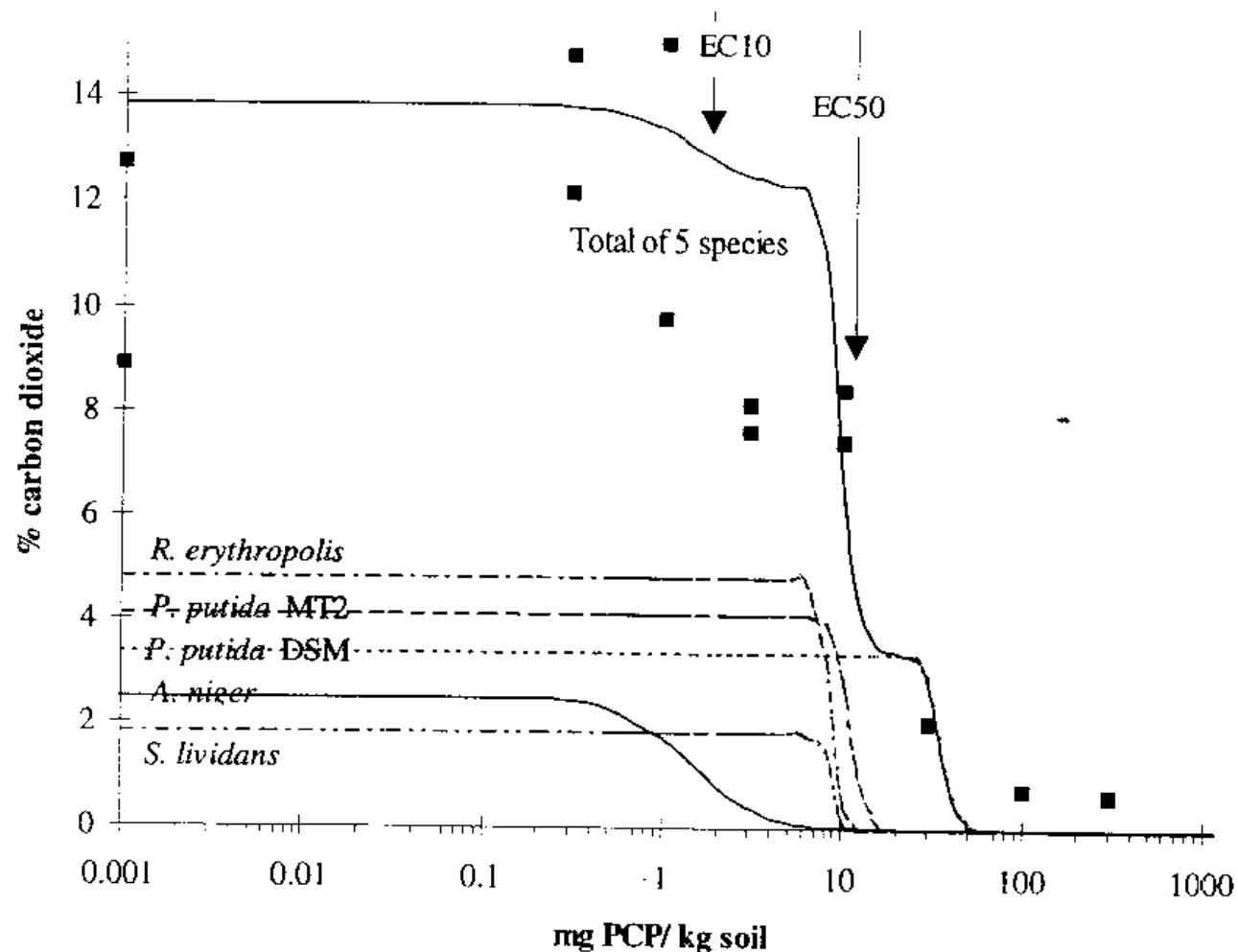


Figure 2. The toxic effect of pentachlorophenol on the mineralization of [^{14}C]acetate in a slurry of sterilized artificial soil amended with five strains of micro-organisms. The square data points show the experimental results whereas the curves show model calculations that were derived from single species toxicity tests. The curve marked "Total of 5 species" is the sum of the $^{14}\text{CO}_2$ production from the five individual strains derived from single species toxicity data. The controls without pentachlorophenol were drawn arbitrarily at 0.001 mg PCP/kg soil because zero can not be plotted on a logarithmic chart.

Mineralizace uhlíku

Je hlavním parametrem pro posuzování vedlejších účinků chemikálií na půdní mikroflóru (další je mineralizace dusíku) v normovaných testech (EPPO, EPA, SETAC, OECD).

Tyto testy byly původně vyvinuty pro testování přípravků na ochranu rostlin, lze je však užít na jakékoliv prospektivní hodnocení vlivů látek na půdní mikrobiální společenstva.

- EPA (1996): OPPTS 850.5100 Soil microbial community toxicity test. Ecological effects test guidelines. United States Environmental Agency.
- EPPO (1994): Decision making scheme for the environmental risk assessment of plant protection products. EPPO Bulletin 24, Chapter 7, Soil Microflora.
- Lynch, M.R. (1995): Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. SETAC, Brussels, Belgium.
- OECD (1999): Proposal for a new guideline 217. Soil microorganisms: Carbon transformation test. OECD guideline for the testing of chemicals. OECD.

Mineralizace uhlíku - testy účinků na půdní mikroflóru

- standardizovány v podobě laboratorní inkubace definovaného vzorku půdy s paralelním měřením různých parametrů v různých časech od počátku pokusu

- parametry užívané v normách jsou hlavně mineralizace uhlíku (produkce CO₂) a též mineralizace dusíku (ISO 14238:1997; OECD 217), lze ovšem měřit i jiné parametry (C_{bio}, N_{bio}, potenciální respiraci a potenciální mineralizaci dusíku)

- půda použitá pro test - přirozená půda, která je vybrána tak, aby byla citlivá vůči kontaminaci a splňovala tzv. "nejhorší scénář", tj. maximální expozici mikroorganismů polutantu v této půdě:

- více než 70% písku
- pH 5,5 - 7,0
- C_{org} 0,5 - 1,5%
- C_{bio}/C_{org} více než 1%
- kationtová výměnná kapacita vyšší než 70 mmol/kg

- tato reálná půda by měla být v historicky známé době **nekontaminovaná**, alespoň testovanou látkou

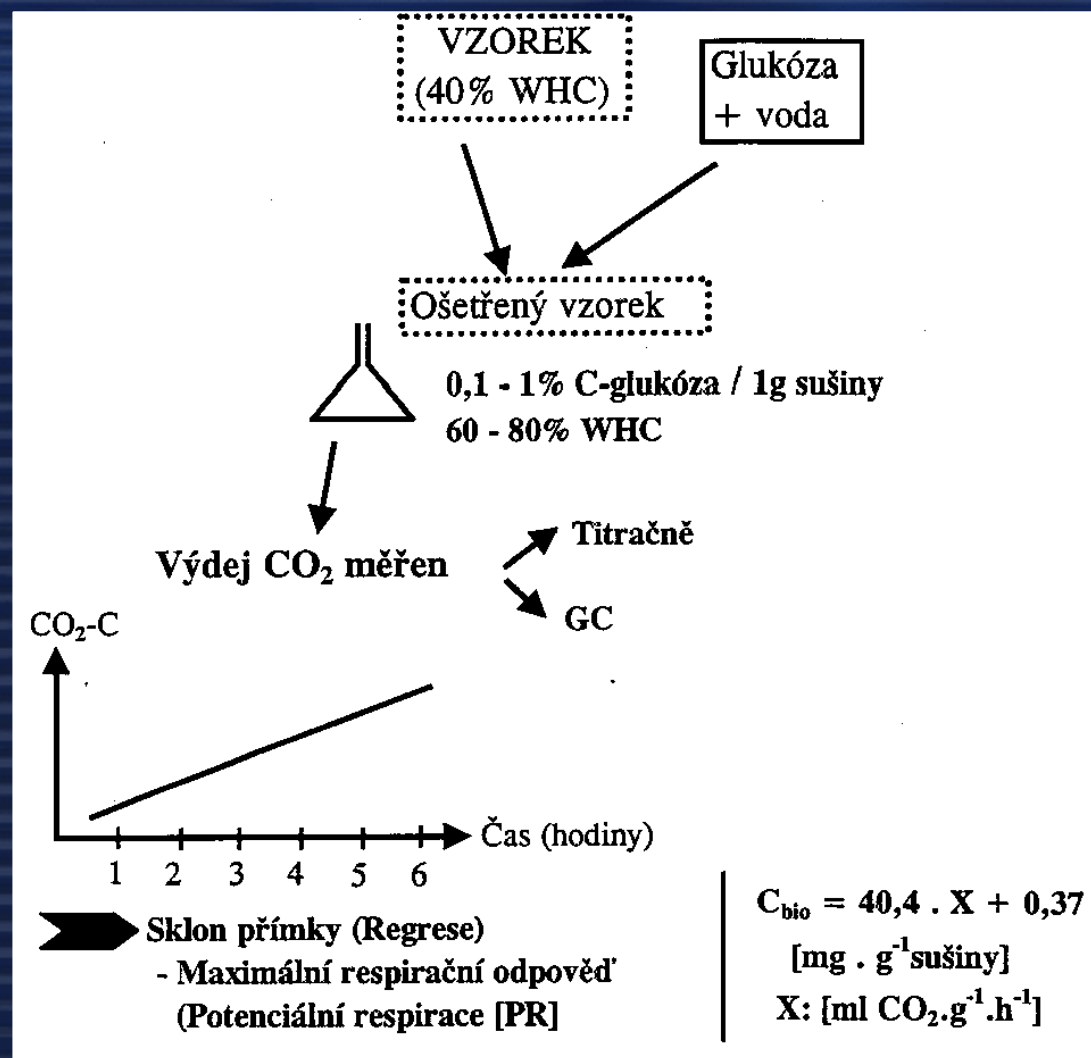
Alternativy:

vzhledem k možnosti přítomnosti resistantních mikroorganismů v reálném společenstvu existují postupy, kdy je do sterilizované přirozené půdy inokulována specifická kultura mikroorganismů (*Pseudomonas putida*)
====> plynulý přechod k "solid phase testům"

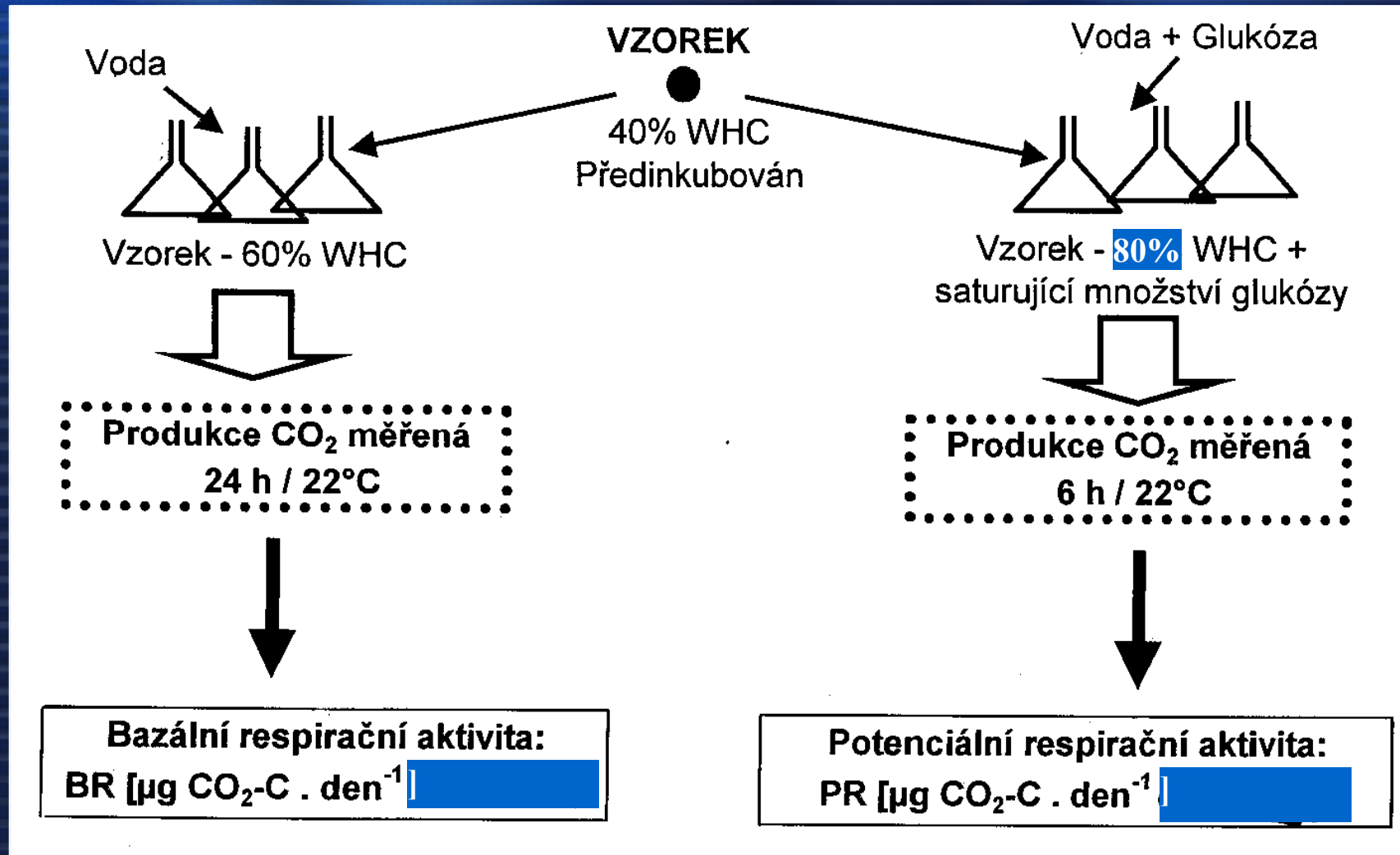
Mineralizace uhlíku - potenciální respirace

- po přidavku lehce využitelného substrátu není již respirace limitována substrátem a dostáváme obraz potenciální respirace - PR - která odráží skutečné energetické potřeby a mineralizační aktivitu mikrobiálního společenstva

- měření např. jako produkce CO₂ v metodě SIR



Mineralizace uhlíku - potenciální respirace



Příklad:

Rozdělení využití přidaného substrátu mezi respiraci (= získání energie) a růst (= tvorbu biomasy) může být chápáno jako obraz energetického stavu mikroorganismů a odráží působení stresu

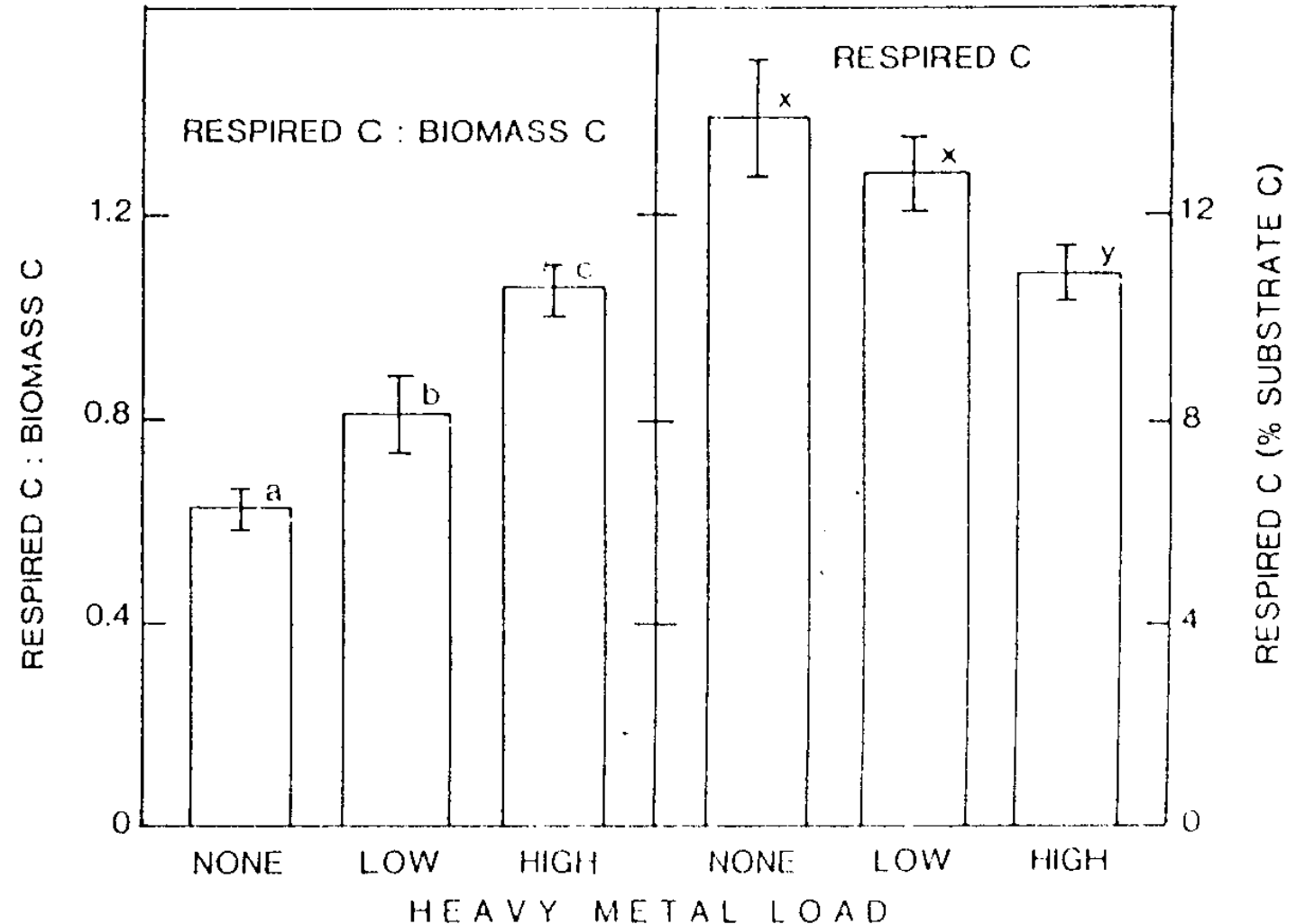


Fig. 2. Effect of pH of simulated rain, containing the 'high' heavy metal load, on partitioning of assimilated substrate C by the microbial biomass of ponderosa pine needle litter. Letters indicate significant ($p \leq 0.05$) differences between means; bars indicate \pm standard error of the mean.

Mineralizace uhlíku - nutná přítomnost TEA (terminal elektron acceptor):

Obsah O₂ v prostředí:

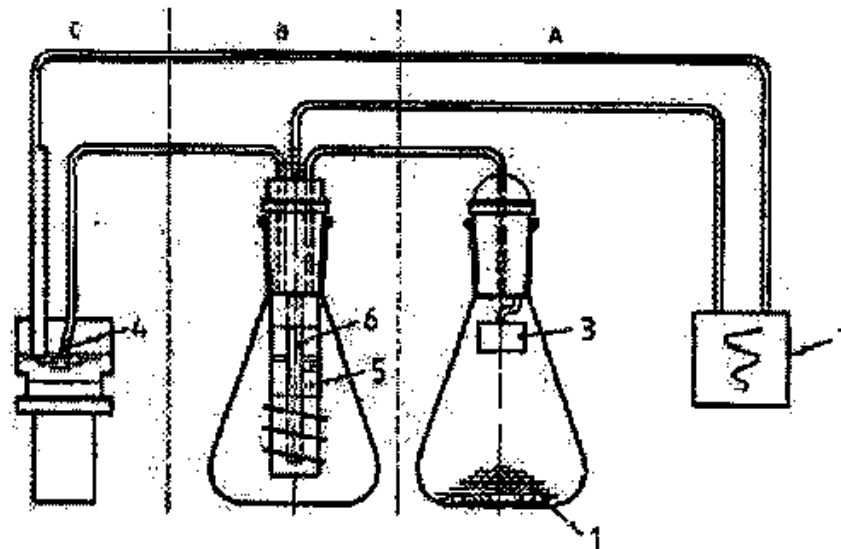
- měření koncentrace kyslíku jako biochemical oxygen demand (BOD)
- přirozená tendence vody je, mít obsah 10 mg/L
- aerobní aktivity zůstávají při 1-2ml/L
- BOD je mírou aerobních aktivit a růstu v kalech, sedimentech a vodních systémech, neboť kyslík je v nich limitujícím nutrientem aerobních mikroorganismů
- lze měřit stav jednorázový, či změnu v čase, např po přidání kalu k biodegradovatelné látce apod.

Mineralizace uhlíku - metody měření

- několik možností; buď jako produkce oxidu uhličitého či spotřeba kyslíku

1) Měření respirace spotřebou O₂:

- systém, kde je ubývající kyslík nahrazován elektrochemicky



Key

A	Reaction vessel	1	Soil sample	5	Electrolyte
B	Oxygen generator	3	CO ₂ absorbent	6	Electrodes
C	Pressure indicator	4	Pressure cell	7	Recorder with display

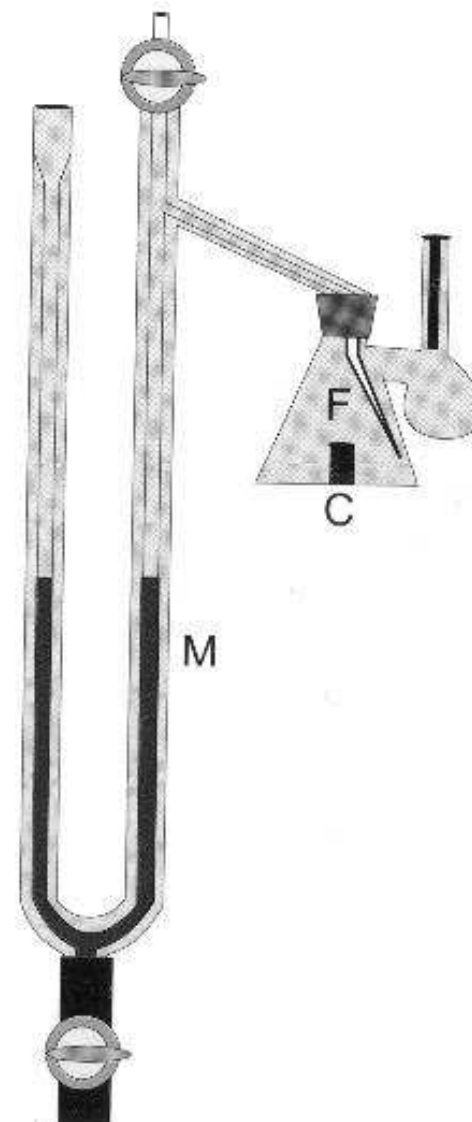
Figure 1 — Determination of O₂ consumption (connection scheme of a measuring unit)

Mineralizace uhlíku - metody měření

ad 1) Měření respirace spotřebou O_2 :

- manometrické měření úbytku kyslíku
- Warburgův respirometr

FIGURE 11.10 Warburg constant volume respirometer. In this setup, a flask (F) of known volume is connected to a manometer (M) containing a liquid of known density. The flask holds a suspension of bacterial cells, and has a center well (C) which contains an alkali trap for CO_2 so that CO_2 evolved does not interfere with O_2 measurement. Oxygen consumption will result in a drop in pressure within the flask, as recorded by a drop in the fluid level within the manometer. Critical factors are to 1) hold the temperature in the flask constant by incubating the flask in a water bath between manometric readings, and 2) shake the flask during incubation to ensure that oxygen exchange between the atmosphere and bacterial suspension is not a limiting factor during microbial respiration. CO_2 production can also be measured in a Warburg constant pressure-type manometer. This is done by comparing pressure changes in two identical flasks, but only one flask contains an alkali trap for CO_2 . The difference in pressure decrease between flasks in which CO_2 is present or absent can be used to calculate CO_2 production.



Mineralizace uhlíku - metody měření

ad 1) Měření respirace spotřebou O_2 :

- elektrochemické stanovení, využití např. v mikroelektrodách a respirometrech

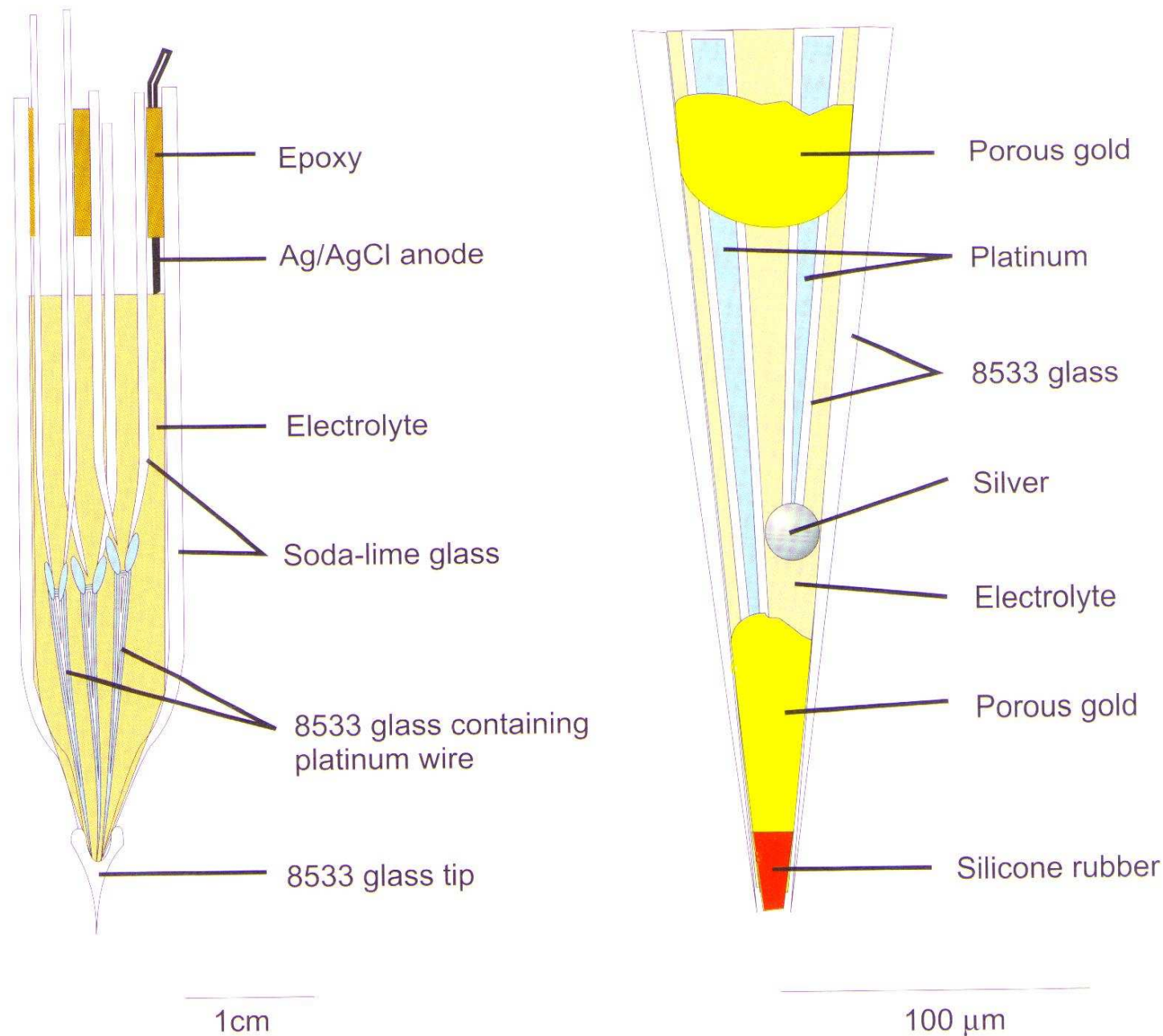


FIGURE 11.18 Microelectrodes used to study biofilms. On the left is the microsensors used for analysis of O_2 and N_2O . There are three cathodes within the outer casing; one is shown behind the plane of the two others. On the right, the tip of the microsensors is enlarged 250 times. (Adapted with permission from Revsbech *et al.*, 1988.)

Mineralizace uhlíku - metody měření

ad 1) Měření respirace spotřebou O_2 :

- kyslíková próba - elektroda s plynově permeabilní membránou

a

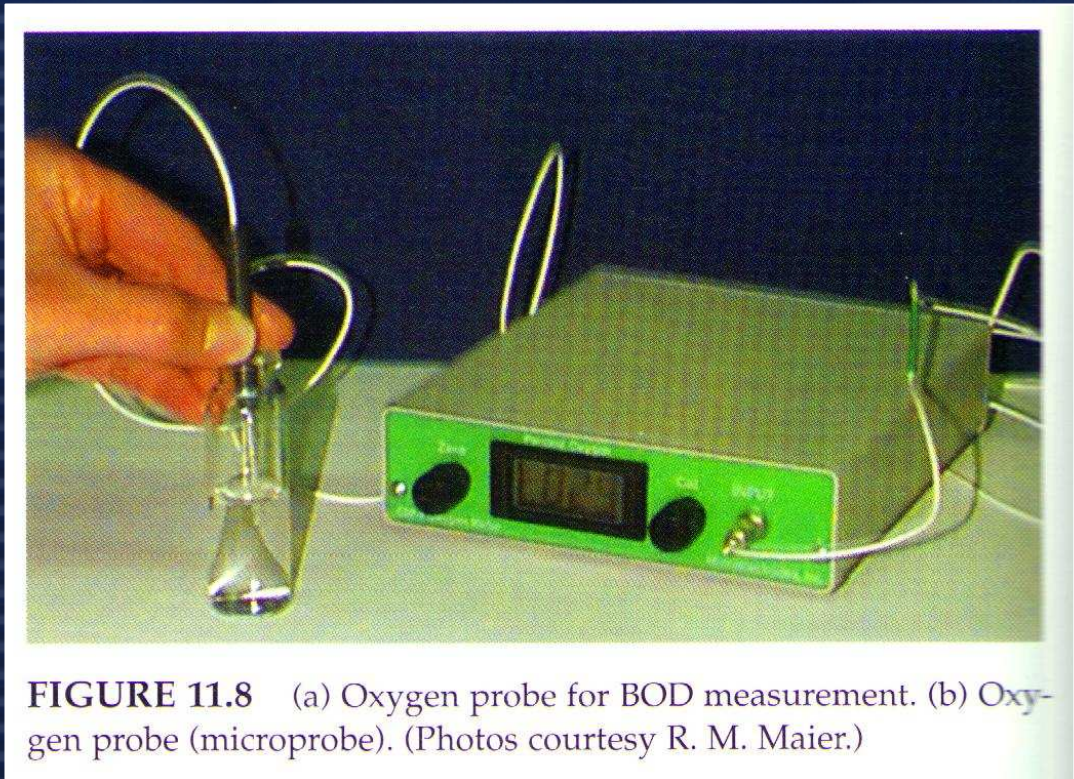


FIGURE 11.8 (a) Oxygen probe for BOD measurement. (b) Oxygen probe (microprobe). (Photos courtesy R. M. Maier.)

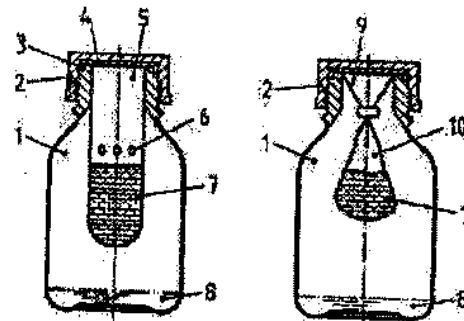
Mineralizace uhlíku - metody měření

- několik možností; buď jako produkce oxidu uhličitého či spotřeba kyslíku (BOD - biological oxygen demand)

2) Měření produkcí CO₂:

v uzavřených láhvích (statický systém)

- změna konduktivity roztoku NaOH
- titrací CO₂ sorbovaného v roztoku NaOH



Key

- | | | | |
|---|----------------------------|----|-----------------------------|
| 1 | Wide mouth flask (250 ml) | 6 | Openings for gas exchange |
| 2 | Screw-cap | 7 | Soil sample |
| 3 | Pour rim | 8 | Sodium hydroxide solution |
| 4 | Closing pad | 9 | Plastic thread |
| 5 | Suspended centrifuge tubes | 10 | Fine mesh woven plastic bag |

Figure 2 — Incubation flasks for the determination of soil respiration

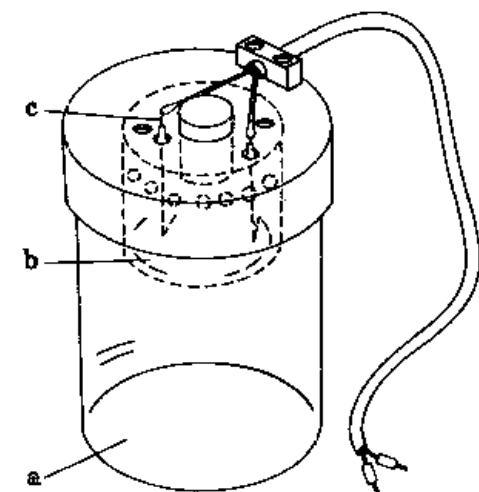


Fig. 1. The experimental jar (a) with the conductivity cell (b) attached to the lid. The platinum electrodes, which are fixed to the lid by melting the plastic around them are also shown (c).

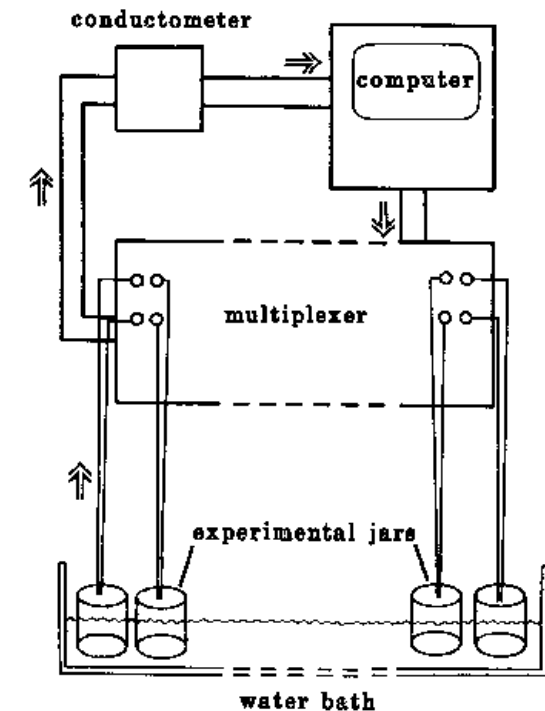


Fig. 2. A system for the continuous monitoring of soil respiration. Twenty-four experimental jars (only four shown) placed in water baths are connected to a conductometer via a multiplexer, that connects each unit in turn. The computer also monitors the multiplexer. The arrows indicate the flow of signals.

Mineralizace uhlíku - metody měření

ad 2) Měření produkcí CO₂:

v uzavřených láhvích (statický systém)

- titrací CO₂ sorbovaného v roztoku NaOH - princip biometru (viz. obr)

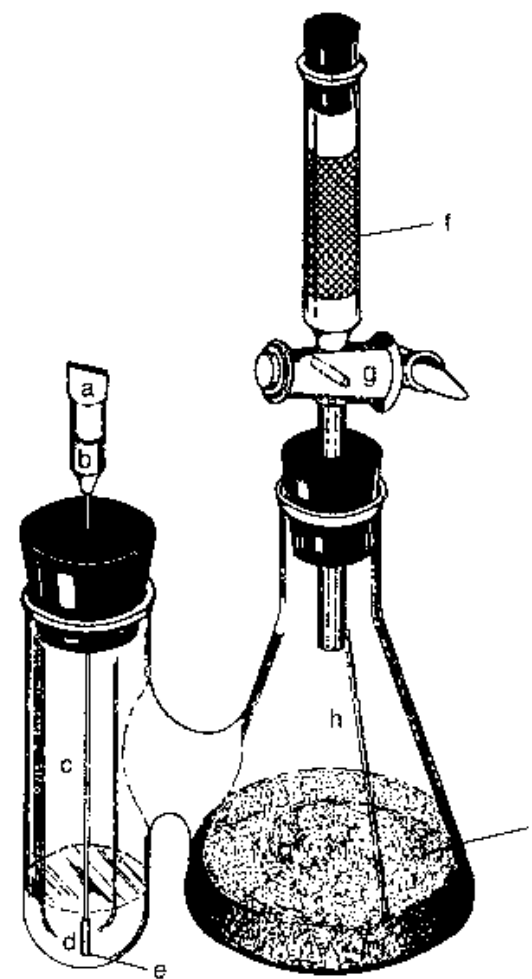


Figure 7.17

The biometer flask, a compact, commercially available enclosed unit used for measuring CO₂ production from soil. The biometer flask has the advantage that one can withdraw and replace the CO₂-absorbing alkali without exposing the system to contamination by atmospheric CO₂. (a) Rubber closure. (b) Syringe needle. (c) Sidearm. (d) Alkali. (e) Needle guard. (f) CO₂ absorbent (ascarite). (g) Stopcock. (h) Sample compartment. (i) soil. (Source: Bartha and Pramer 1965. Reprinted by permission, copyright Williams and Wilkins, Baltimore.)

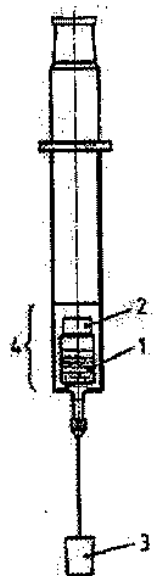
Mineralizace uhlíku - metody měření

ad 2) Měření produkcí CO_2 :

v uzavřených láhvích (statický systém)

- plynovou chromatografií jako headspace analýza

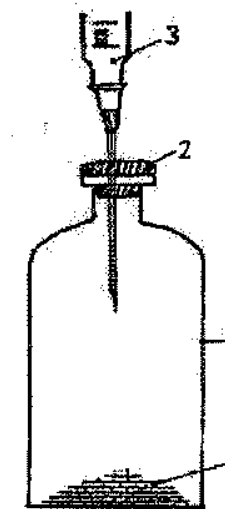
- ve speciální injekční stříkačce



Key

- 1 Soil
- 2 Sample flask
- 3 Rubber stopper
- 4 Accumulation volume (16 ml)

Figure 7 — Glass syringe for the syringe method for incubation of soil samples



Key

- 1 Serum bottle
- 2 Rubber septum
- 3 Gas-tight syringe
- 4 Soil sample

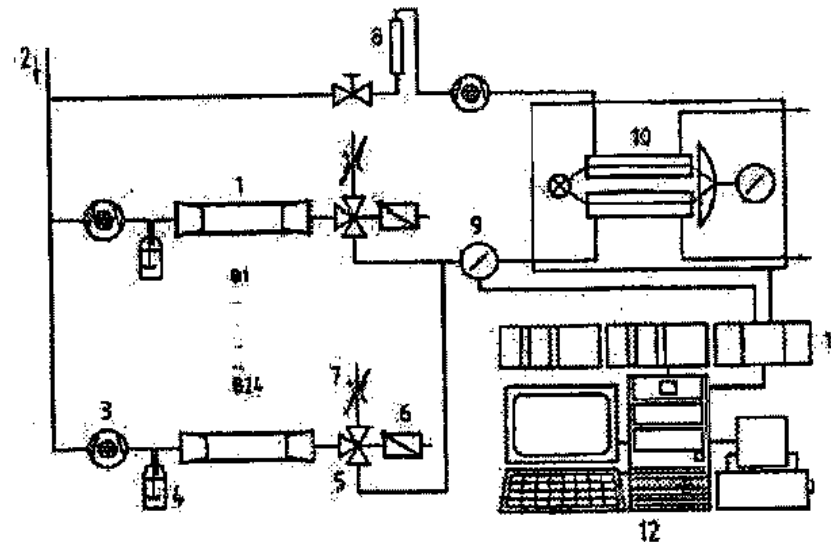
Figure 8 — Determination of soil respiration by gas chromatography

Mineralizace uhlíku - metody měření

ad 2) Měření produkcí CO₂:

v průtočném systému (respirometry)

- detektor IRGA (infrared gas analysis) či plynová chromatografie (např. detektor TCD)



Key

- | | | |
|-------------------------|------------------|---------------------------------------|
| 1 Soil sample container | 5 Valves (3-way) | 9 Flow adjustment and flow meter |
| 2 Air inlet | 6 Steering | 10 Infra-red CO ₂ analyser |
| 3 Gas pump | 7 Closure valve | 11 Control unit |
| 4 Moistener | 8 Reference air | 12 Control and evaluation equipment |

Figure 4 — Example for the system configuration of an infra-red gas analyser measuring equipment for the determination of soil respiration

Mineralizace uhlíku

- lze měřit i výměnu plynů *in situ*

Respirační koeficient

$RQ = \text{CO}_2 \text{ uvolněné} / \text{O}_2 \text{ spotřebované}$



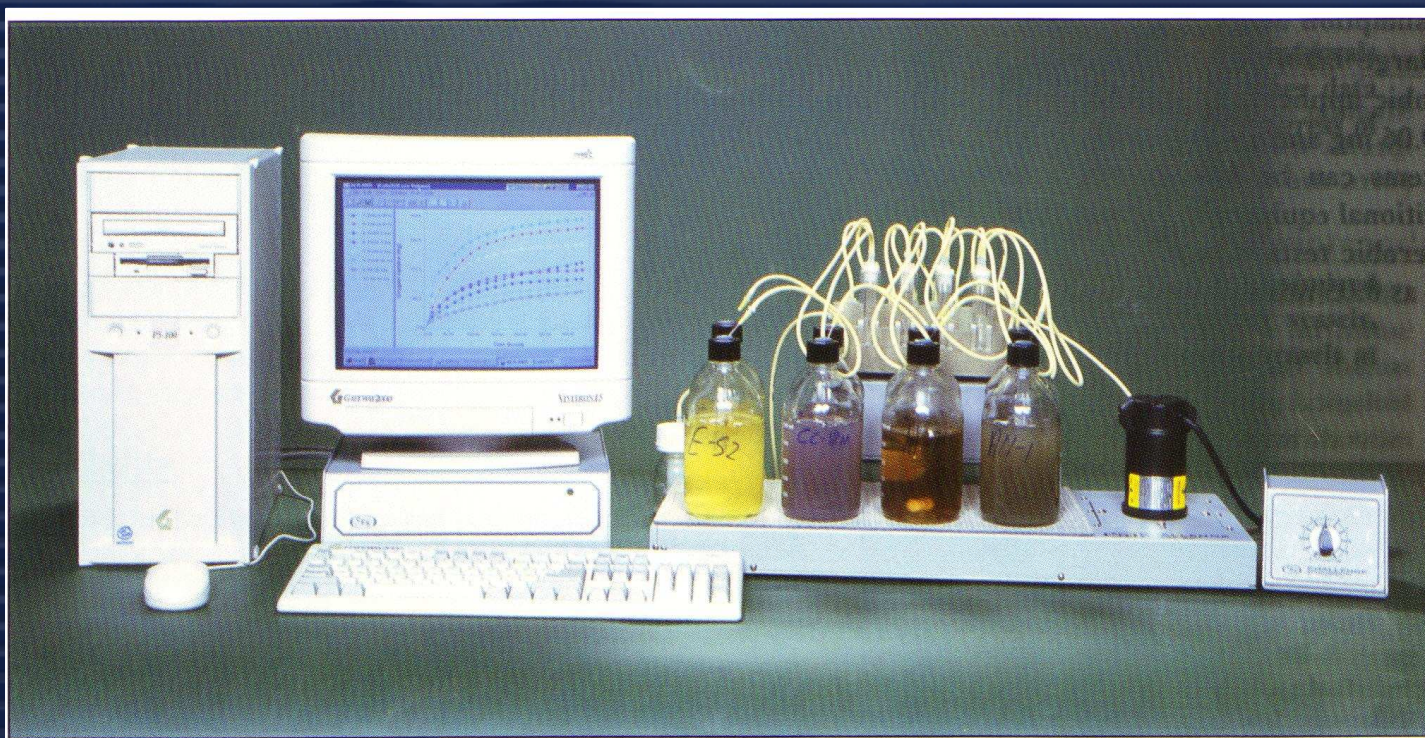
FIGURE 11.14 A field chamber that allows measurement of respiration gases. (From *Pollution Science*, 1996, Academic Press, San Diego, CA.)

Mineralizace uhlíku - respirometrie

- systémy kontinuálně měřící respiraci, přesněji spotřebu kyslíku či produkci oxidu uhličitého
- různé metody detekce, různý design přístrojů

Využití:

- pro aerobní i anaerobní aplikace, pro studium biodegradací, kinetiku růstu sledovanou pomocí produkce produktu atd.

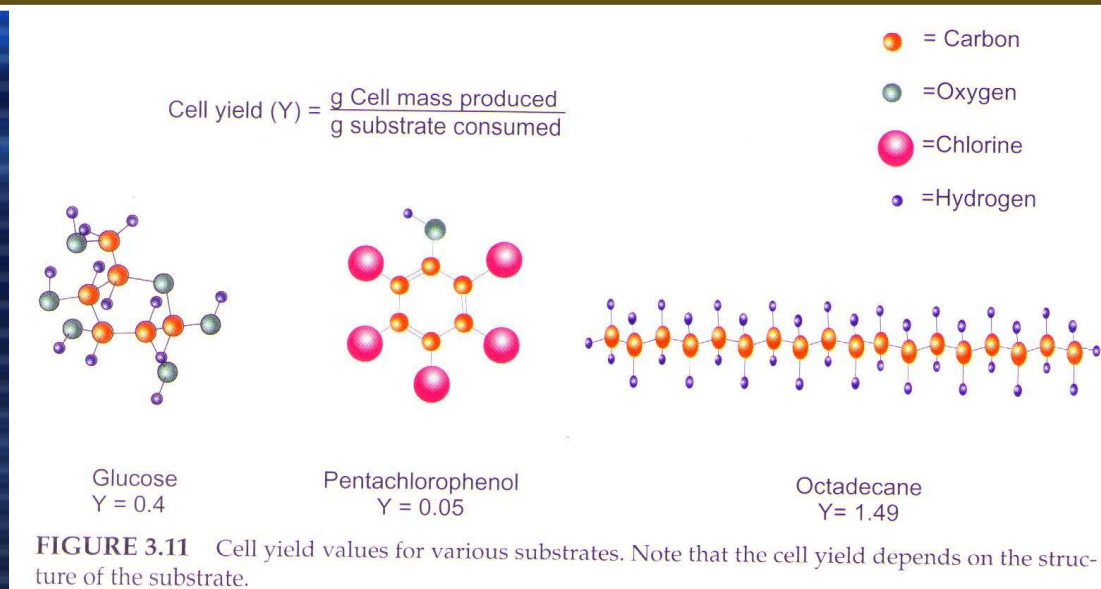


Mineralizace uhlíku - respirometrie - využití v mikrobiální ekotoxikologii

- měření BOD (biochemical oxygen demand) pro odpadní vody
- měření kinetiky respirace po přidání různých substrátů
- měření biodegradačních pochodů
- testování toxicity
- testování stability kompostu
- testování aktivních kalů

Mineralizace uhlíku - biodegradační pokusy

- mineralizace různých substrátů se využívá pro hodnocení biodegradability látek
- měření jako úbytku látek (UV spektrofotometrií, fluorimetrií - PAHs, HPLC, GC, MS ...)
- existuje celá věda kolem biodegradací a řada standardních norem:



Půda

- ISO 15473 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

Voda

- ISO 8192:1986 Water quality -- Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge
- 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

-
- 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

Mineralizace uhlíku - kinetika SIR

- kvantifikace přírůstků produktu (CO₂) díky r-stratégům (growers) a K-stratégům (nongrowers)

$$\frac{dp}{dt} = q \cdot N$$

$$N = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

dp/dt ... formace produktu

N ... aktivní mikroorganismy

q ... specifická aktivita

$$\frac{dp}{dt} = q \cdot N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

rovnice platná pro čisté kultury
a pro reálné environmentální
vzorky

$$p = p_0 + \frac{q \cdot N_0}{\mu} \cdot (e^{\mu \cdot t} - 1)$$

přídavek substrátu

odpověď r-stratégů = růst

odpověď K-stratégů = pouze
zvýšení rychlosti respirace

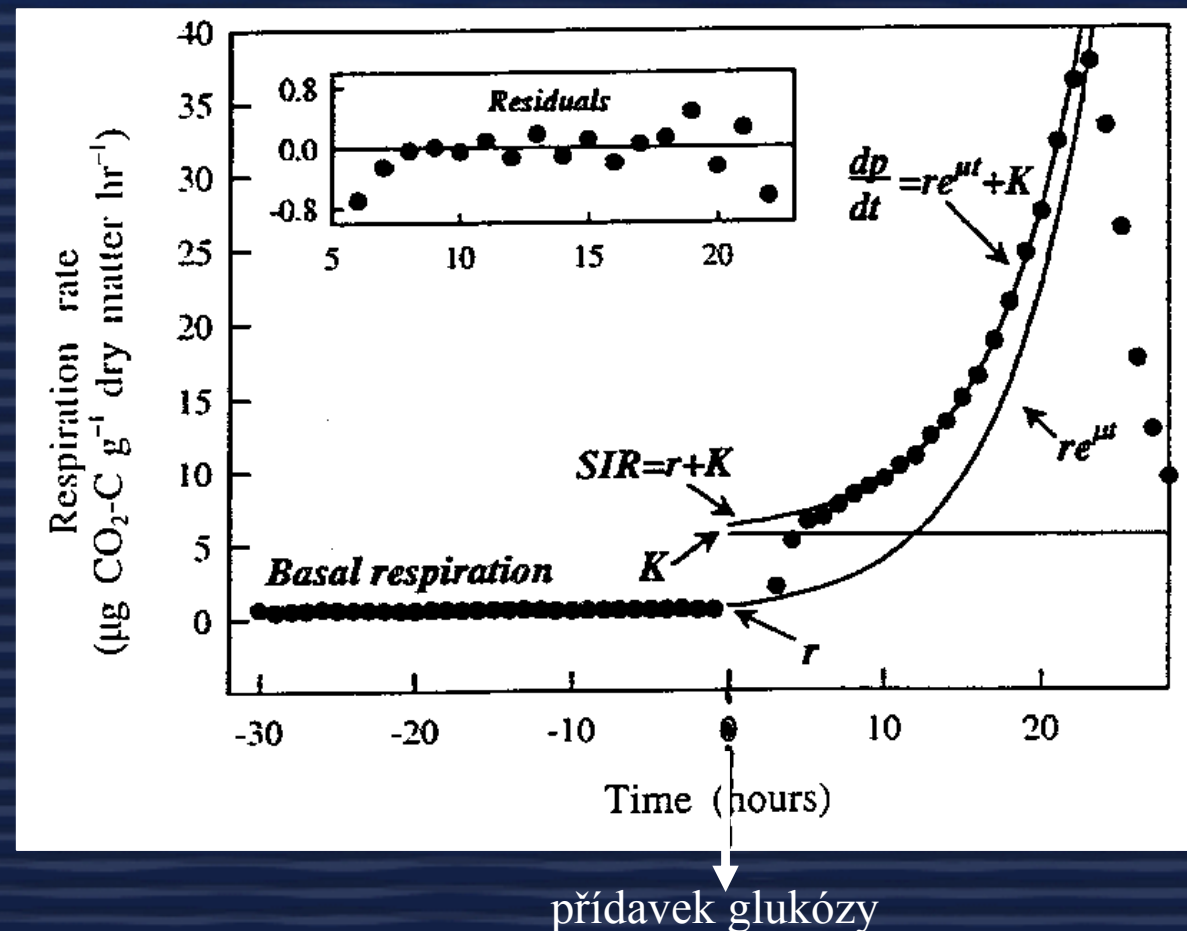
$$dp / dt = r \cdot e^{\mu \cdot t} + K$$

v čase t = 0 je SIR = r + K

$$p = p_0 + \frac{r}{\mu} (e^{\mu \cdot t} - 1) + K \cdot t$$

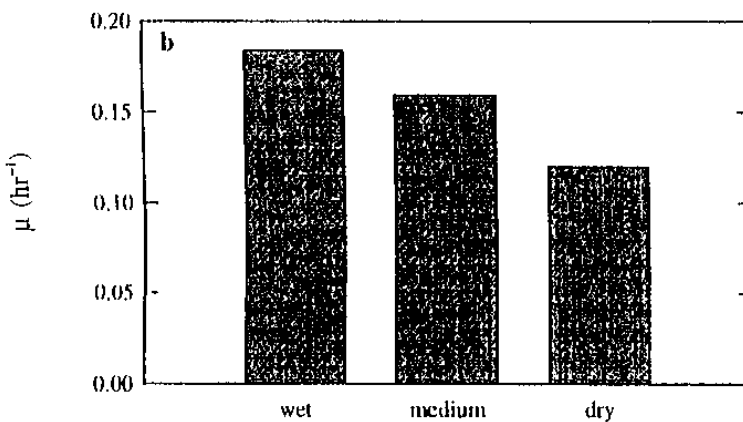
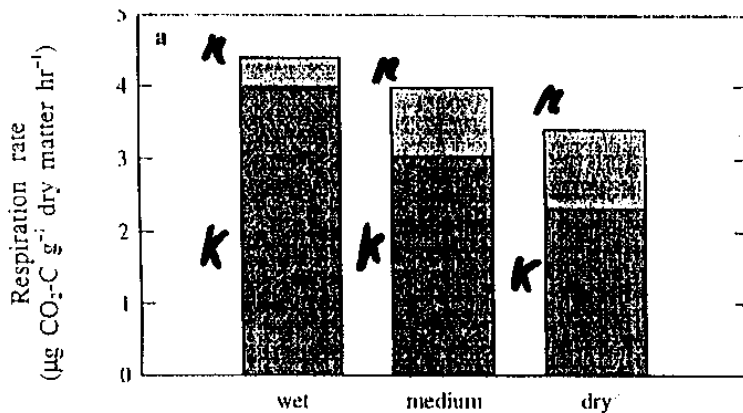
Mineralizace uhlíku - kinetika SIR

- dlouhodobé měření respirace po přidání glukózy (+ amoných iontů a fosfátů jako nezbytných živin)
- před přidáním glukózy je zaznamenána bazální respirace
- v čase $t=0$ narůstá respirace díky respiraci $r + K$ strategií (r - growers; K - nongrowers)
- během další doby je příspěvek K strategií konstantní a nárůst je díky exponenciálnímu nárůstu populace r strategií (dle $r \cdot e^{\mu \cdot t}$) \implies tzv. growth associated product formation



Příklad:

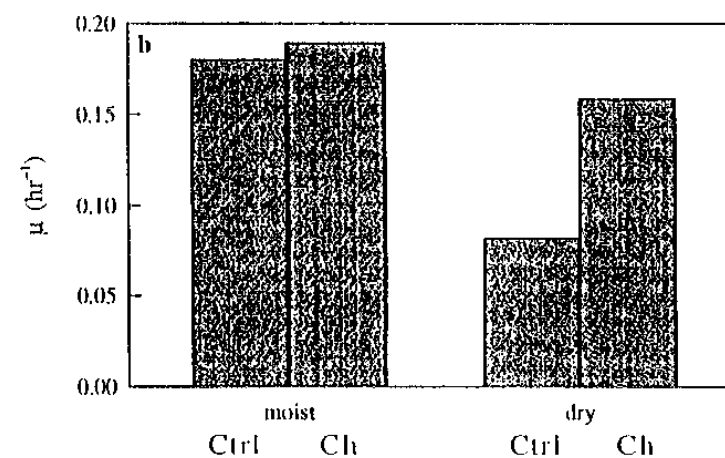
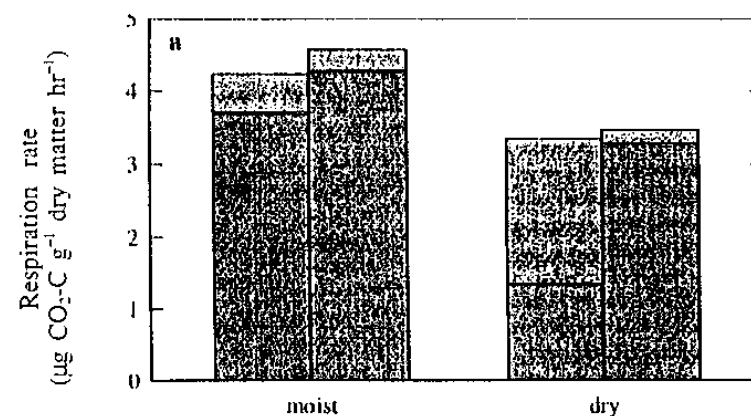
μ , K and SIR increase with increasing soil moisture



The effect (mean of the results from the three soils tested) of moisture on a) SIR and its components K (bottom/blue) and r (top/red); and b) μ .

The initial response of growers (μ) decreased with increasing moisture.

Cycloheximide increased μ and K



The effect (mean of the results from the three soils tested) of moisture and cycloheximide (Ch) on a) SIR and its components K (bottom/blue) and r (top/red); and b) μ . Ctrl = control.

Cycloheximide = fungicide
 → after it - fast growing microf. dominates

Mineralizace uhlíku - kinetika SIR

- existuje i ISO norma: ISO/DIS 17155 Soil quality -- Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves

- metoda stanovení "kontaminace" půdy (tzv. ecotoxic potential) a efektu kontaminace v laboratorních studiích

Důležité parametry:

- lag time - čas od přidavku substrátu do počátku exponenciálního růstu - reflektuje vitalitu "growers"

- růstová rychlost μ

- aktivační koeficient respirace

$$Q_R = R_B/R_S$$

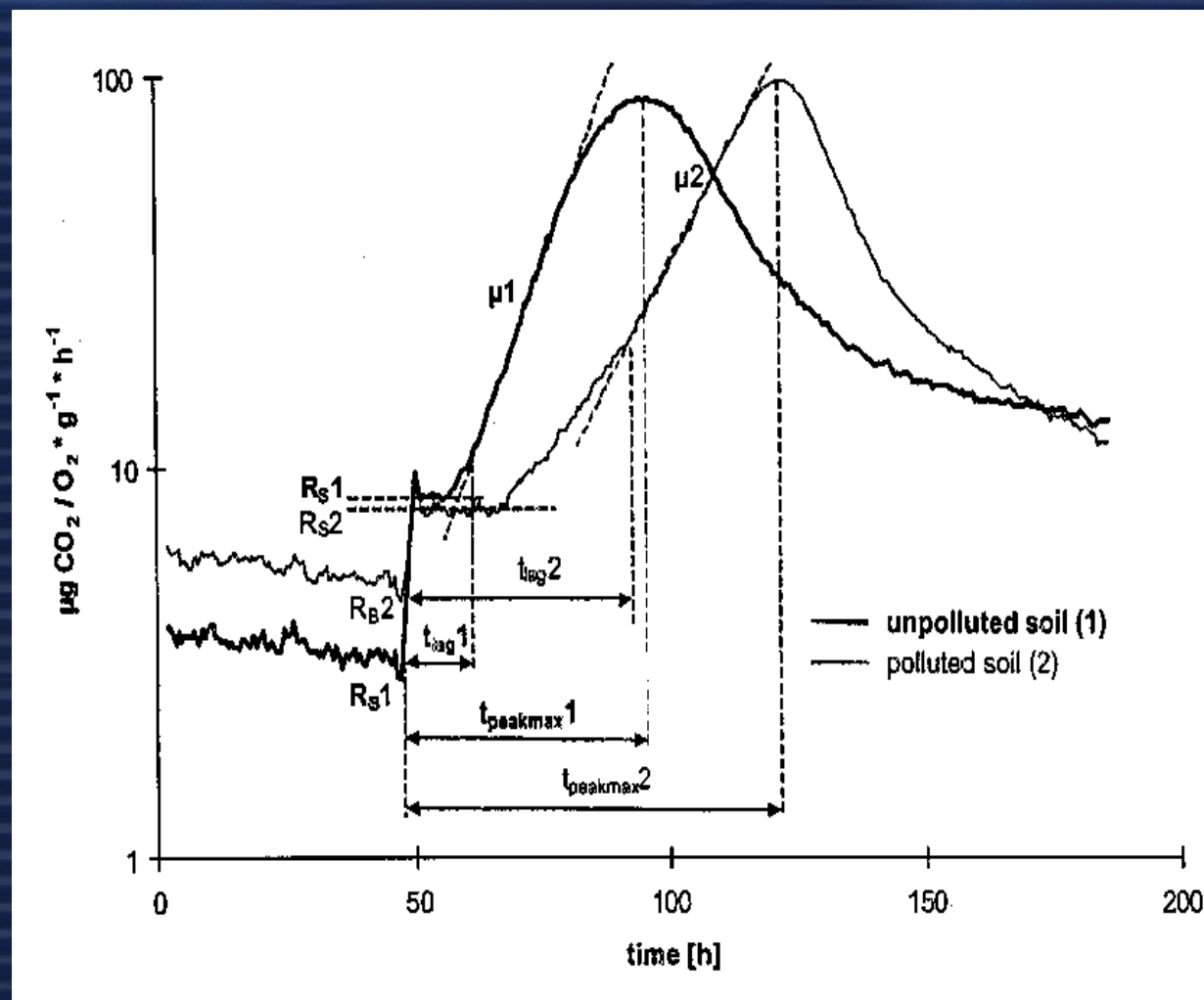
- čas k dosažení píku

Znečištěná půda:

$$Q_R > 0,3$$

$$\text{lag} > 20\text{h}$$

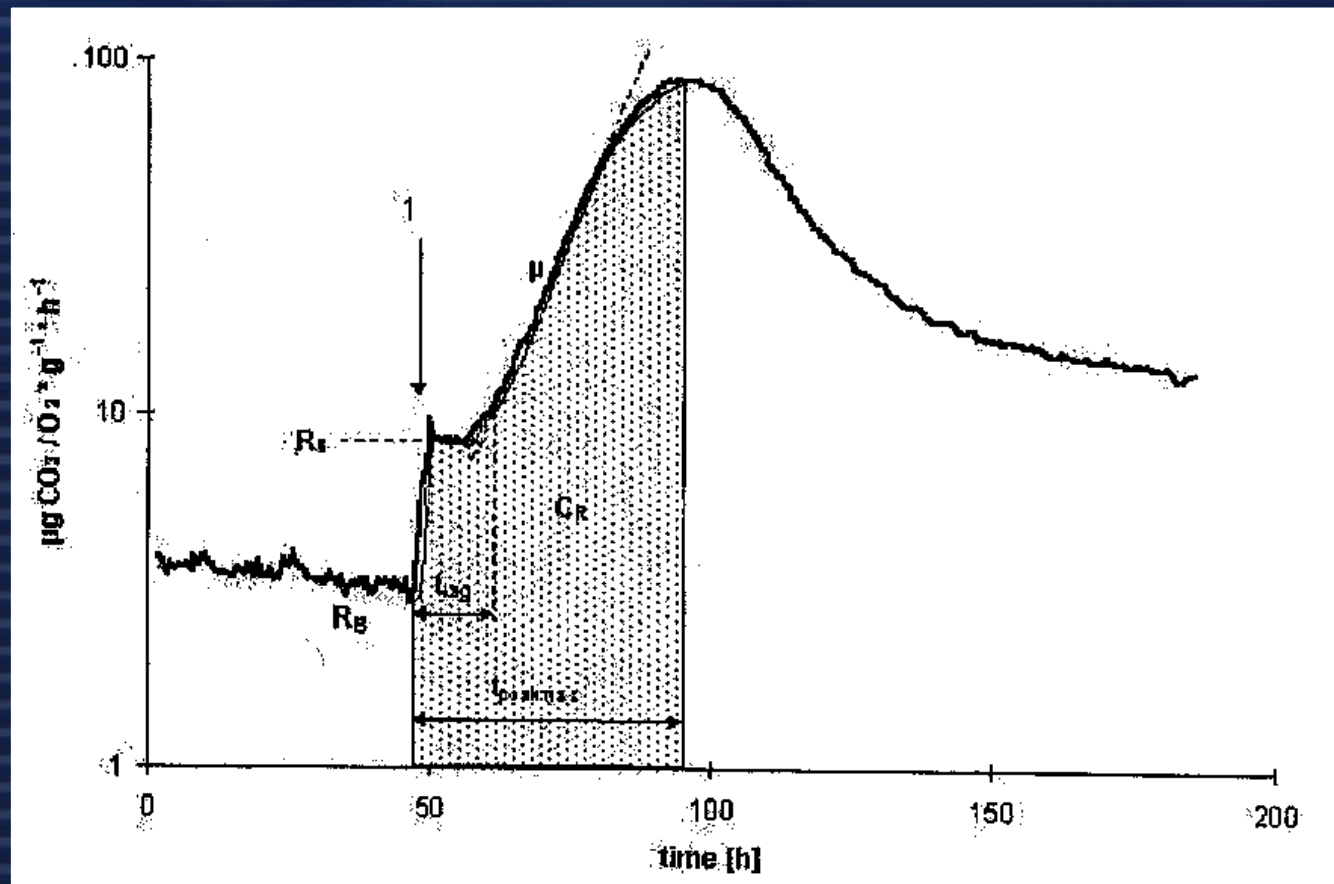
$$t_{\text{peakmax}} > 50\text{h}$$



Mineralizace uhlíku - kinetika SIR

Vliv chemkálií:

- endpointy jsou lag time, μ a C_R , což je kumulativní produkce CO_2 od přidání substrátu do píku
- vynesení hodnot C_R oproti logaritmickým koncentracím testované látky dostáváme klasickou křivku dávka-odpověď S tvaru, z níž lze vypočítat EC



Příklad:

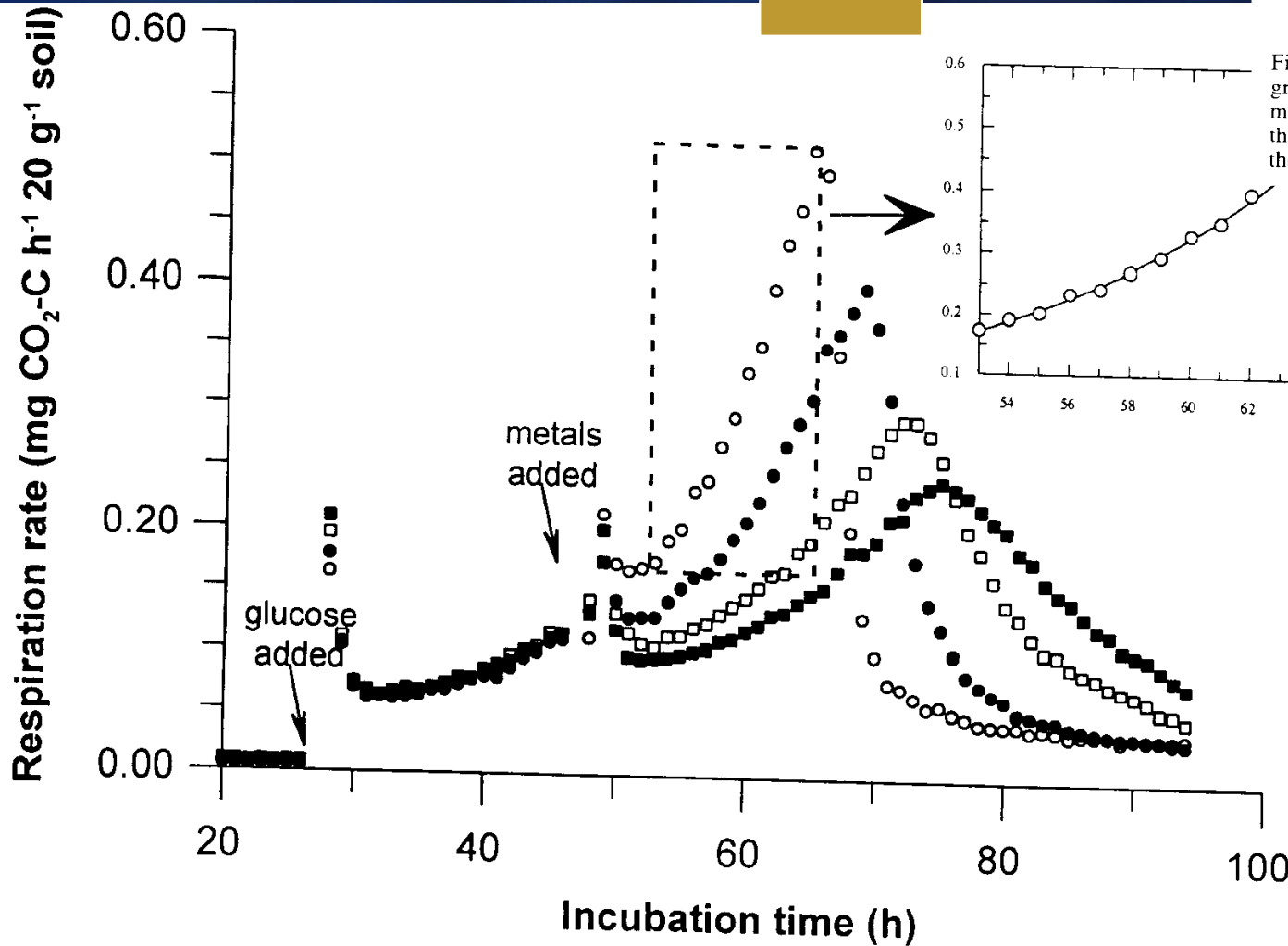


Fig. 3. Respiratory response to glucose (1 mg C/g soil) and to an addition of a solution containing the equivalent of 300, 900, or 1,500 $\mu\text{g Zn/g}$ in the early exponential phase. The control received distilled water. The inset shows the fit of the data to a first-order rate equation by nonlinear regression used to calculate the specific growth rate.

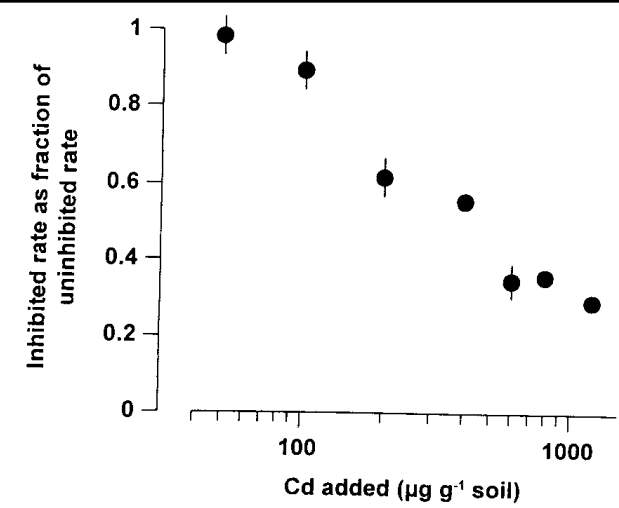


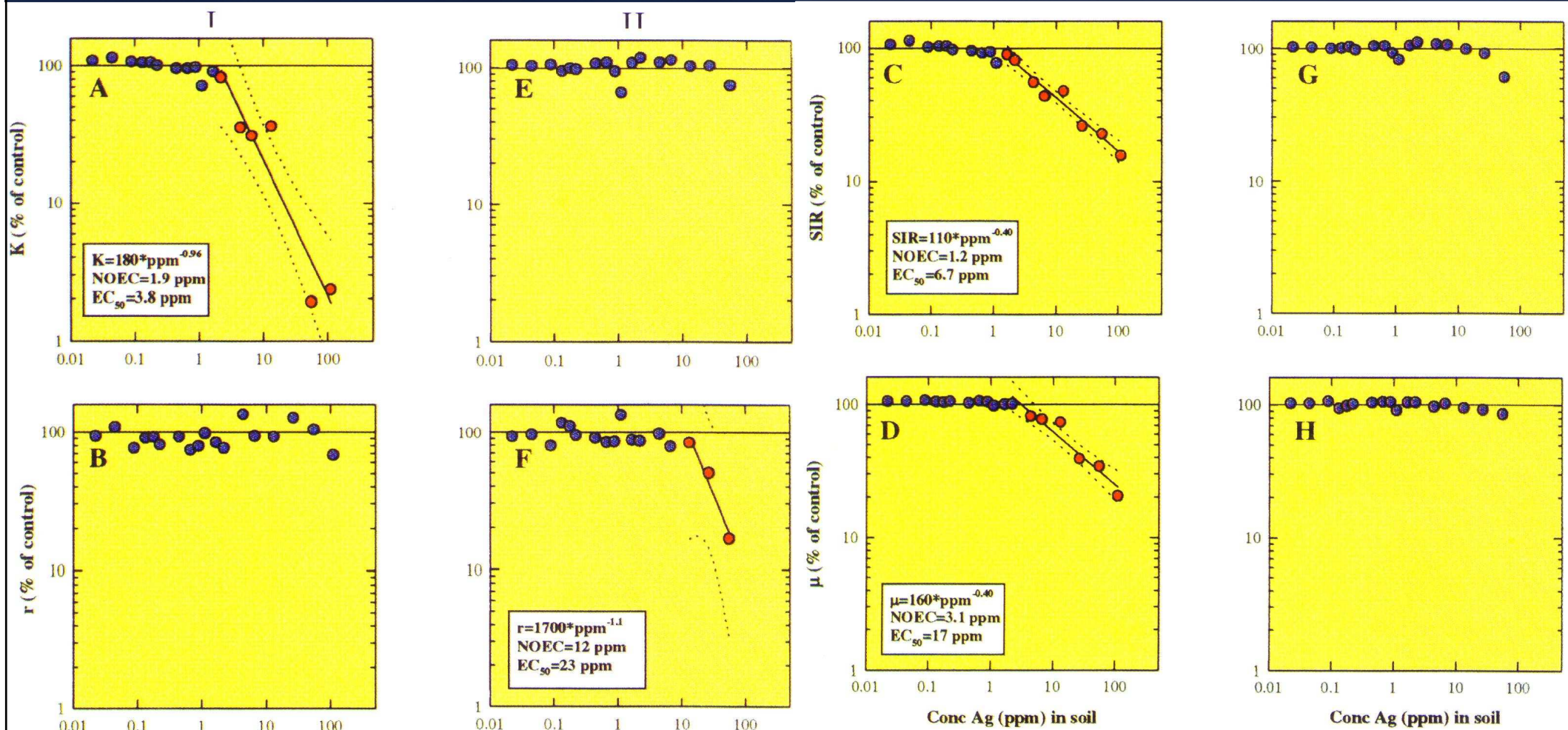
Fig. 4. Dose-response curve for the inhibition of the specific microbial growth rate by the addition of Cd to the soil that had received 100 m^3 unamended sewage sludge per hectare per year. Mean values of three replicate soil samples from the same plot. Error bars indicate the standard error.

- Control
- Zn300
- Zn900
- Zn1500

Příklad:

Kinetics of Substrate - induced Respiration (SIR) and Denitrification: Applications to a Soil Amended with Silver

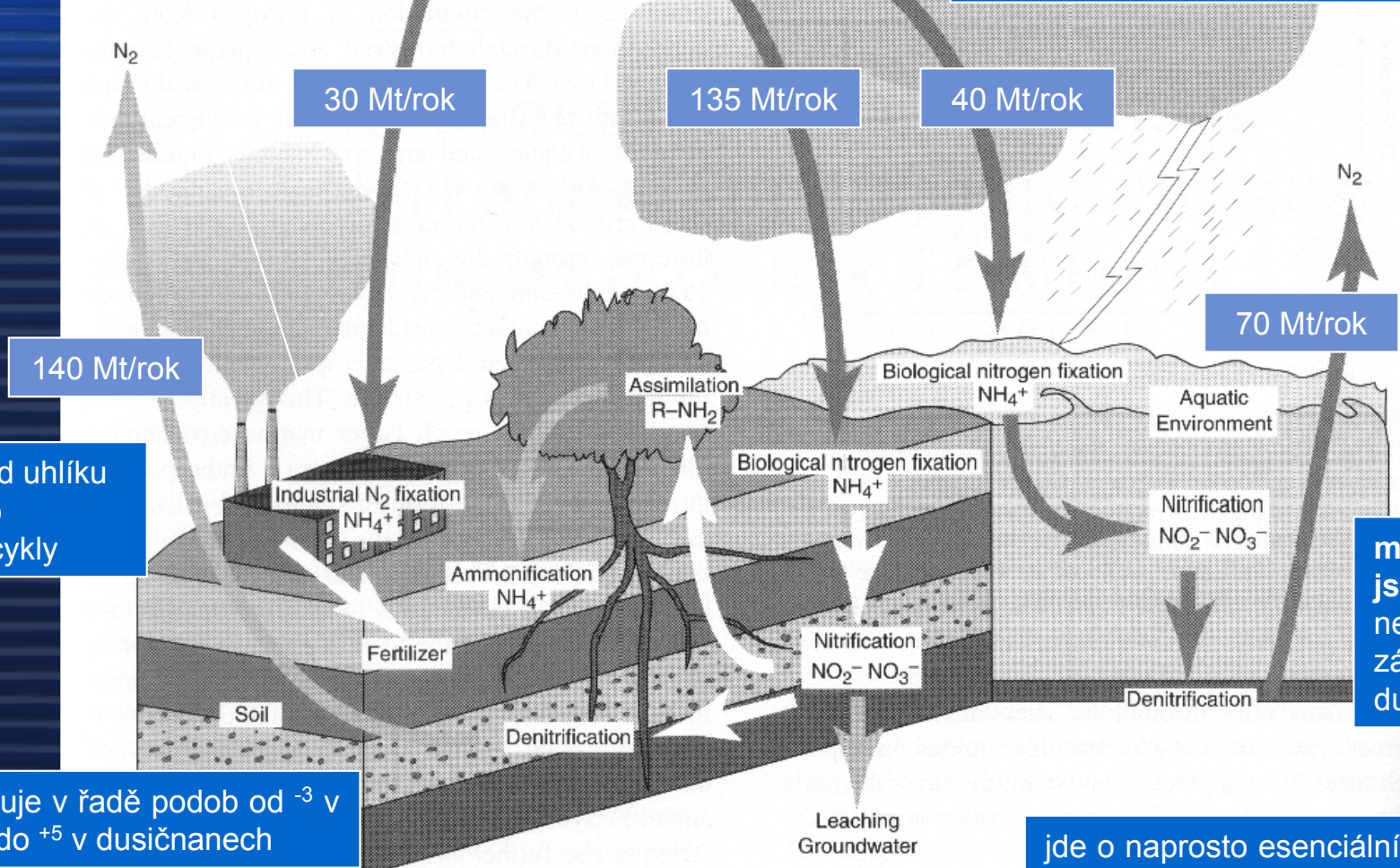
- S tímto přístupem bylo možno studovat růst a aktivitu odděleně
- Parametry odvozené z tohoto přístupu se ukázaly citlivější než samotné BR, zejména K a μ
- Tento přístup se ukázal jako vhodný pro objasnění mechanismů toxicity na mikroorganismy



Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku

vstup antropogenní představuje asi 1/5 biologické fixace!!

hlavní zásobárna je atmosféra, fixace N_2 je pomalá, oproti tomu neustálý cyklus různých jiných forem N v půdě je intenzivní



na rozdíl od uhlíku jde spíše o minerální cykly

mikroorganismy jsou stěžejní, neboť katalyzují zásadní přeměny dusíkatých látek

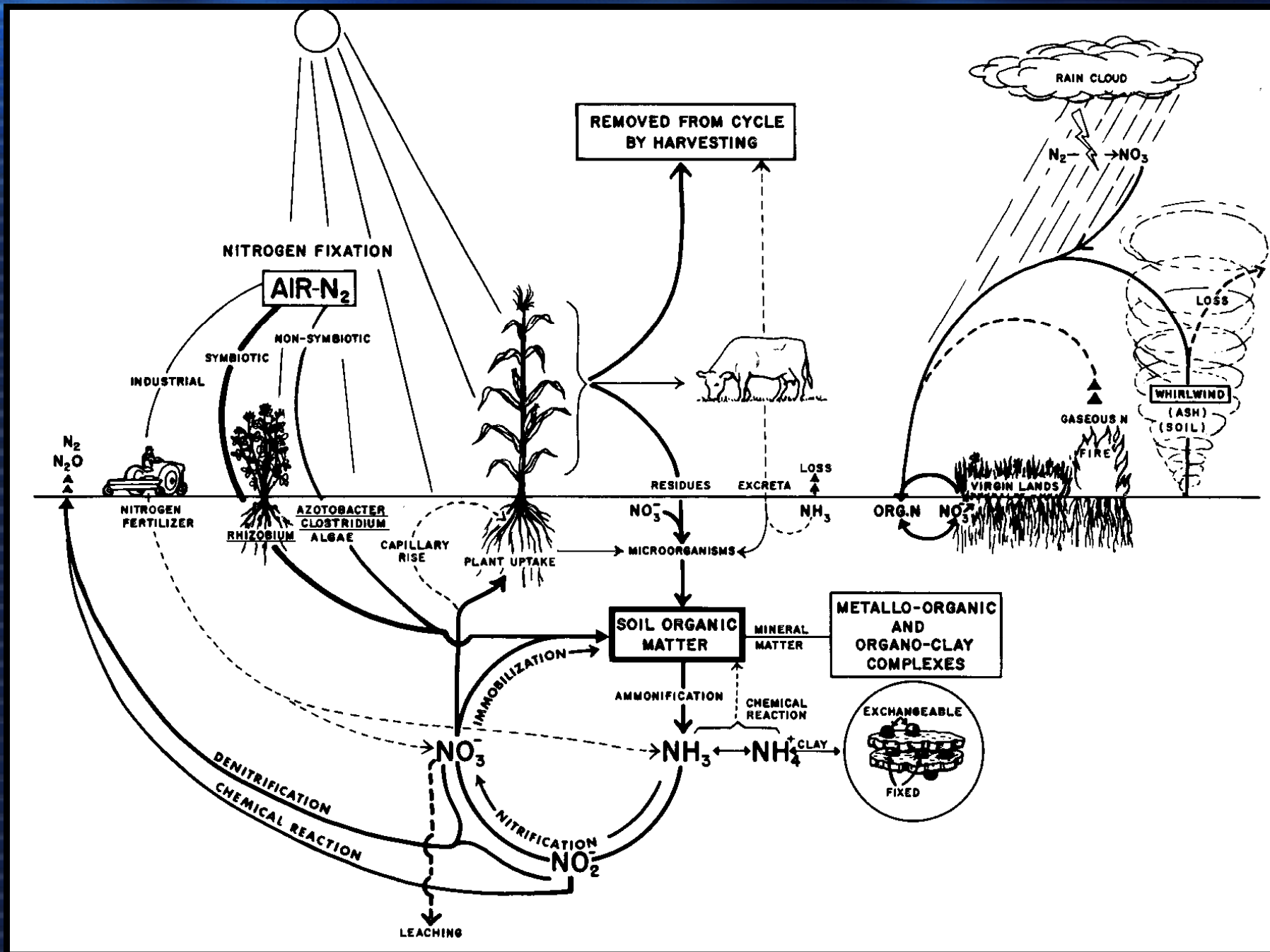
dusík existuje v řadě podob od -3 v amoniaku do $+5$ v dusičnanech

jde o naprosto esenciální prvek pro rostliny a mikroorganismy většinou jej potřebují v jiných formách než N_2

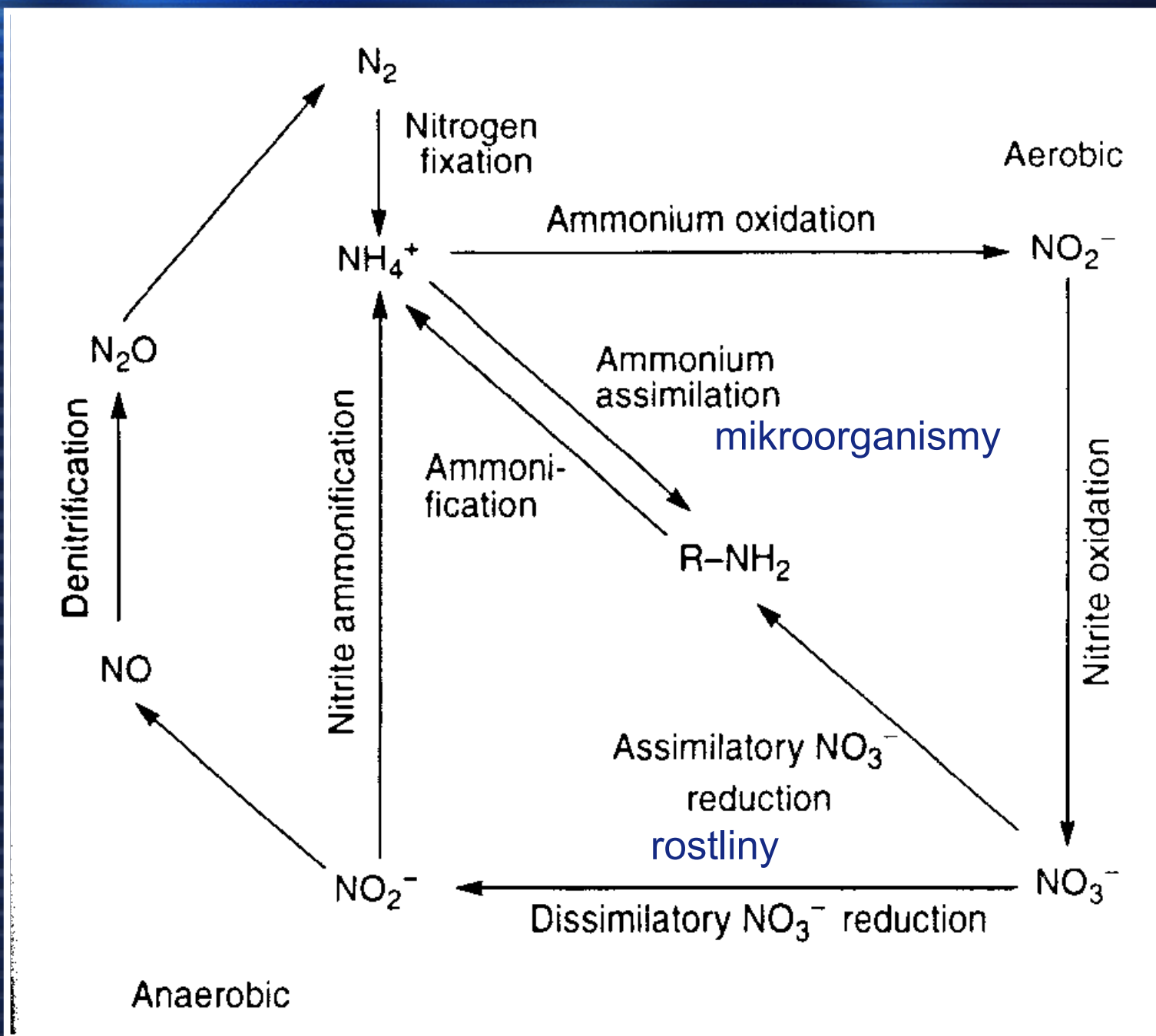
Figure 11.2

The individual processes of the nitrogen cycle in different zones within soil and aquatic habitats. Biological nitrogen fixation, anthropogenic inputs of industrially produced nitrogen fertilizer, and nitrogen oxides formed in reactions associated with lightning move nitrogen from the atmosphere to the soil and water. Nitrification alters the ionic charge of the fixed forms of nitrogen so that leaching occurs in soils. Denitrification in anaerobic soils and sediments returns molecular nitrogen to the atmosphere.

HLAVNĚ PŮDA



Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku



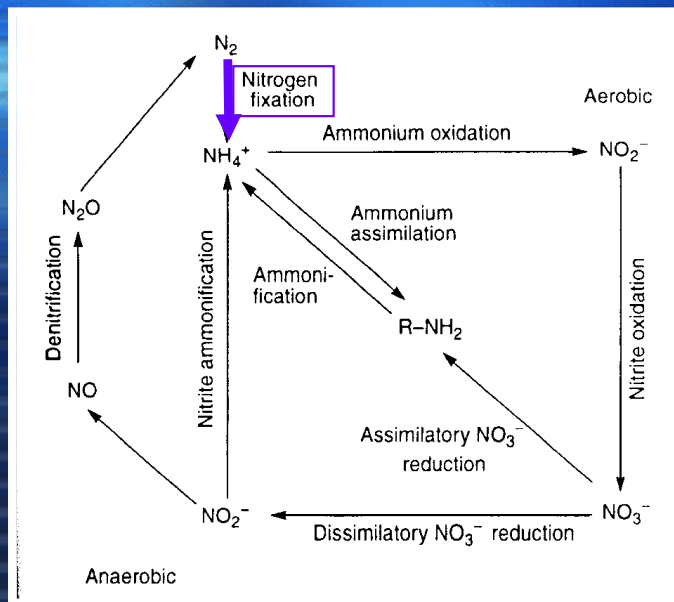
Mikroorganismy jsou naprosto stěžejní:

- 1) kromě sinic a symbiotických bakterií nedovedou organismy poutat N_2
- 2) zpětné uvolňování dusíku do atmosféry
- 3) transformace forem dusíkatých sloučenin

AKTÉRIE A PROCESY ZÚČASTNĚNÉ NA KOLOBĚHU DUSÍKU.

Fixace dusíku		Oxidace sloučenin dusíku (tvorba dusitanů a dusičnanů)		Redukce dusičnanů (tvorba amoniaku a denitrifikace)	
Nesymbiotické bakterie (volně žijící bakterie)		Nitrobacteraceae		Bakterie způsobující amonifikaci bílkovin a denitrifikaci, využívající NO_2^- a NO_3^- jako akceptory vodíku	
Symbiotické bakterie (žijící sym- bioticky s vřesovými rostlinami)		Jiné bakterie oxidující NO_2^- na NO_3^-			
Azotobacteraceae	Jiné bakterie	Oxidace			
		NH_3 na NO_2^-	NO_2^- na NO_3^-		
Azotobacter Azomonas Beijerinckia Derxia	Enterobacter Nocardia Clostridium Rhodospirillales	Rhizobium	Nitrosomonas Nitrosococcus Nitrosolobus	Nitrobacter Nitrospina Nitrococcus	Nocardia Streptomyces
				Thiobacillus denitrificans Pseudomonas stutzeri Některé druhy rodu Bacillus aj.	

Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - Fixace dusíku



- N_2 je fixován do NH_3 : $N_2 + 6e^- \rightarrow 2NH_3$ (+630 kJ/mol)
- sinice (hlavně ve vodách - *Aphanizomenon*, *Nostoc*, *Anabaena*); symbiotické bakterie (*Rhizobacteriaceae* - luštěniny); kolem 100 druhů volně žijících bakterií aerobních i anaerobních (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Clostridium*)
- systémy se liší v množství poutaného dusíku; nejvíce fixují symbiotické asociace, neboť v okolí kořenů je přísun živin

• jde o proces spotřebovávající energii; probíhá jen v dobrých podmínkách; **je tedy citlivý endpoint ke stresu**

• **inhibující vliv** má obecně amoniak a pro volně žijící fixátory vysoké koncentrace kyslíku; některé ale mají systém chránící nitrogenázu před působením kyslíku

Organism groups^a

kg N fixed ha⁻¹ year⁻¹

Free-living heterotrophic bacteria

1 – 2

Cyanobacteria

5 – 30

Symbiotic associations

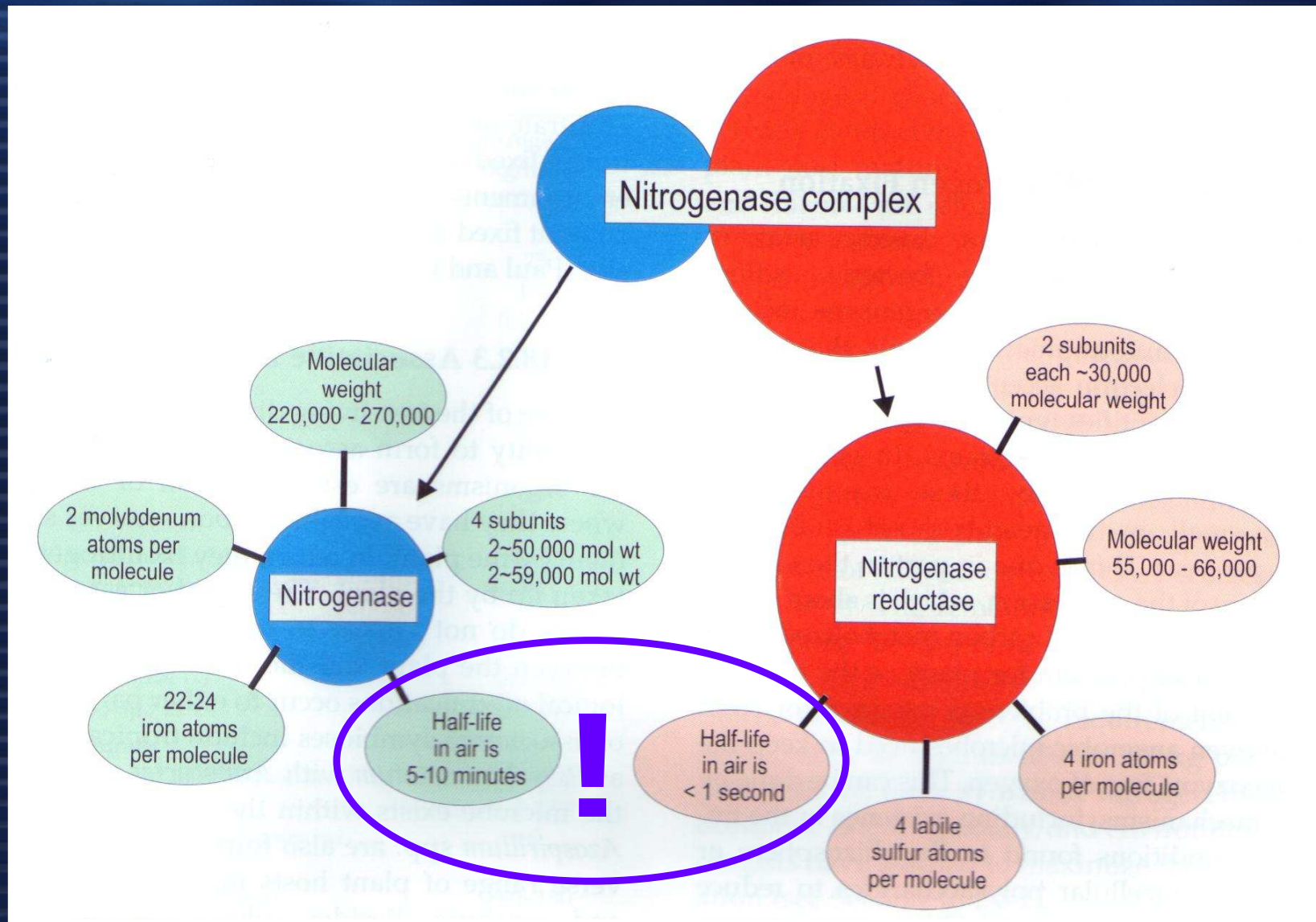
100 – 200

(e.g., *Rhizobium*-clover)

Pozn.: organismy kterým stačí N_2 jako jediný zdroj dusíku se nazývají diazotrofní

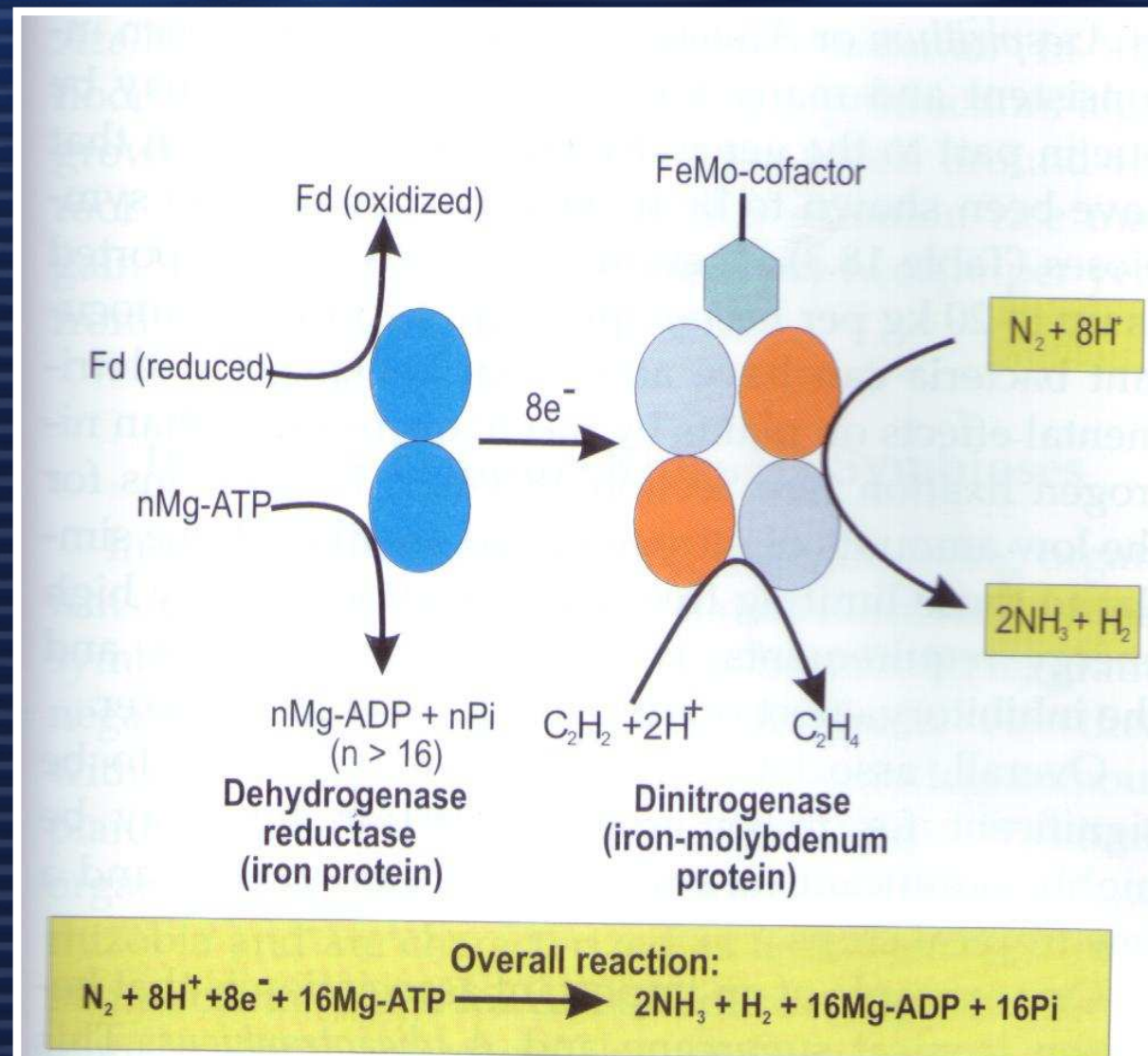
Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - Fixace dusíku

- ústředím této schopnosti je enzymový **NITROGENÁZOVÝ KOMPLEX**: (di)nitrogenáza-reduktáza (Fe protein) má funkci při redukci (di)nitrogenázy (Mo-Fe proteinu), která redukuje N_2 na NH_3
- nitrogenáza je kódována tzv. *nif* geny



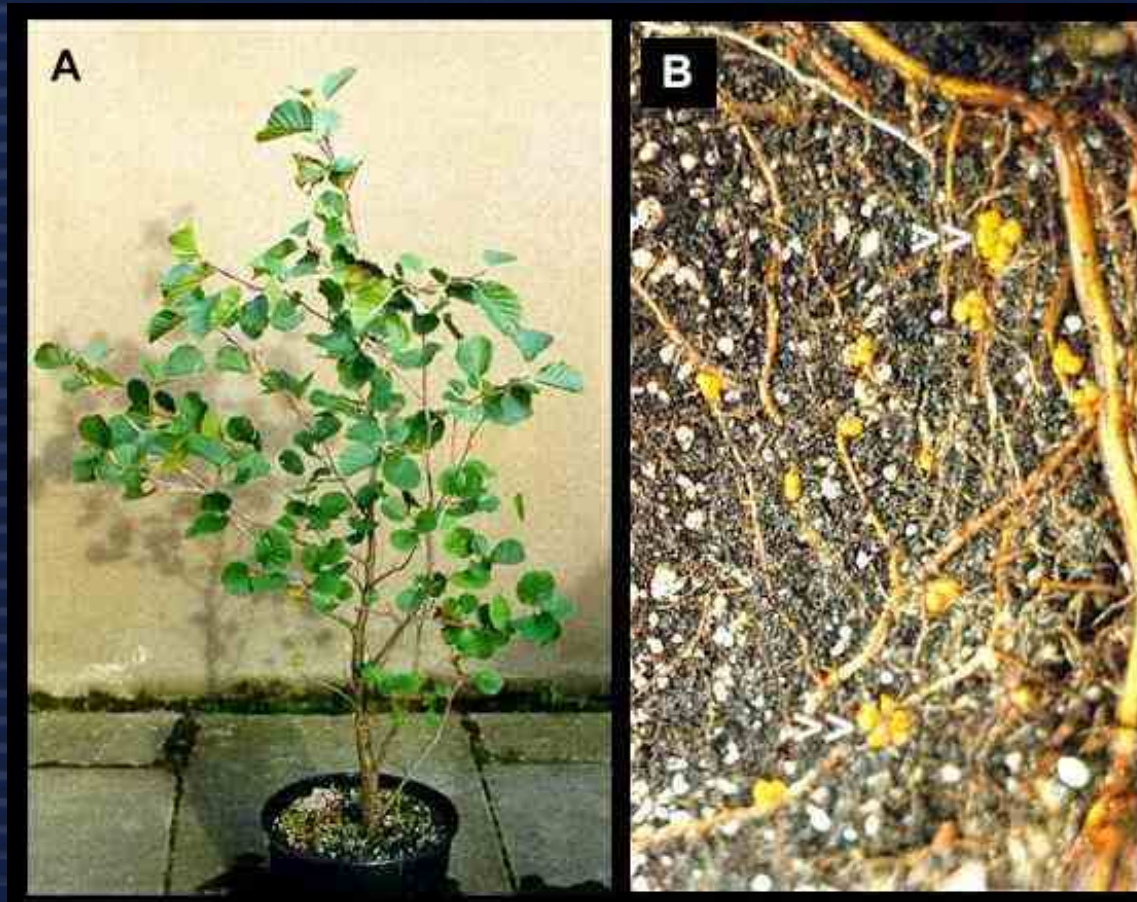
Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - Fixace dusíku

- proces je velmi pomalý (jedna molekula cca 1,25 sec) a fixující bakterie mají vysoký obsah těchto proteinů
- enzym také dokáže redukovat jiné molekuly: kyanid, N_2O , CO , C_2H_2 (poslední je principem hojně užívané metody Acetylene Reduction Assay)



Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - Fixace dusíku

- spolupráce mikroorganismů a rostlin mají povahu symbiózy, kdy mikroorganismus dodává dusík a využívá dostupné zdroje substrátu v okolí či uvnitř rostlinných kořenů
- **kauzální či asociační symbióza** - nevyžaduje morfologické změny mikroorganismu ani rostliny, ani genetické interakce; je záležitostí volně žijících fixátorů, kteří se asociují s některými rostlinami v jejich rhizosféře (cukrová třtina, rýže, žito ..) či dokonce uvnitř tkání kořenů
- v lesních ekosystémech je významná symbióza dřevin s aktinomycetou *Frankia*



Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - Fixace dusíku

- **symbióza luštěniny-*Rhizobium*** - vzniknou fyziologické změny obou organismů - vznikají kořenové hlízky (nodule)
- bakterie se mění v tzv. bakteroid a dochází ke genetické interakci mezi rostlinou a bakterií
- proces je složitý, ale poměrně dobře popsán: zapojují se regulační faktory od rostliny (flavonoidy) → bakterie produkuje **nodulační gen kódující nod faktory** (např. lipochitooligosacharid - LCO), které interagují s rostlinou a iniciují tvorbu nodulí
- 1 - 2 týdny po infekci jsou viditelné hlízky
- fixovaný dusík je exportován do kořenové tkáně jako asparagin či purin
- nitrogenáza je chráněna tzv. leghaemoglobinem

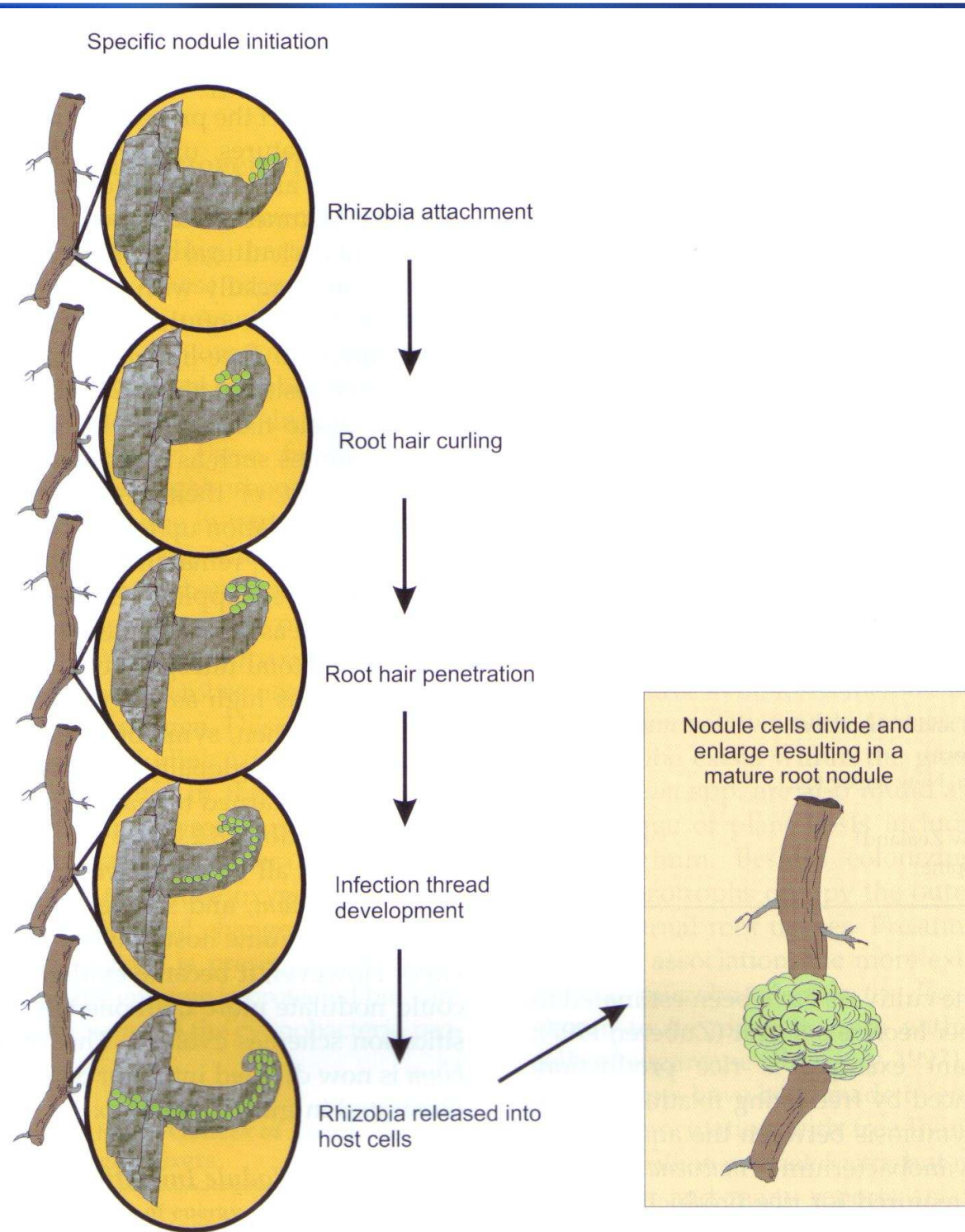




FIGURE 18.9 Transmission electron micrograph of bacteroids enclosed with the peribacteroid membrane. W; cell wall, V; vacuole, h; bacteroid (note that several bacteroids are enclosed within a membrane of plant origin) h; poly- β -hydroxy butyrate storage granule within a bacteroid, pl; plastid. (Photo courtesy I. L. Pepper)



Měření:

Acetylene reduction assay (ARA)

- využívá větší afinity nitrogenázy pro acetylen
- systém s půdou, případně i s rostlinami, je vzduchotěsný
- prostor nad půdou se z 10% nasatí acetylénem či směsí acetylen-kyslík a po několika hodinách se měří ethylen
- redukováný ethylen se stanovuje GC s FID detektorem
- užívá se faktor 3 molů ethylenu na 1 mol fixovaného N_2
- **je velmi citlivou, levnou a jednoduchou metodou**

-alternativou je měření fixace ^{15}N - nutná drahá instrumentace (IRMS)

- může se také sledovat rychlost růstu organismů na médiu bez dusíku

- často se sleduje také přítomnost hlízek u cílových rostlin

Příklad:

V půdách kontrolovaného pokusu byly sledovány buňky *Rhizobium leguminosarum* schopné tvořit hlízky u jetele po ošetření různým množstvím čistírenského kalu s obsahem těžkých kovů a dusičnanů. Půdy se také lišily v pH. Byl pozorován zřejmý vliv pH, typu kalu a obsahu těžkých kovů na velikost populace rizobijních bakterií i na fixaci dusíku.

Table 3. Plant and Nodulation Characteristics of *T. repens* Grown in Braunschweig Experimental Soils

Sample	Mean yield (mg)	Yield Sd	Mean nodule number ^a	Nodule number Sd	ARA (+/-) Y/N? ^b	Nodulation in agar	MPN of effective cells (cells/g dry soil)
"High" pH trial							
1	8.6	0.2	3.0	0.6	+ (3)	Y	920
2	5.1	0	6.2	4.3	+ (3)	Y	15860
3	4.9	0.3	3.8	0.7	+ (3)	Y	9160
4	9.6	0.5	<1	0.1	+ (3)	Y	370
5	5.9	1.0	0	—	—	Y	130
6	12.9	0.5	4.8	1.3	+ (3)	Y	45670
7	7.9	1.7	1.8	0.7	+ (3)	Y	350
"Low" pH trial							
1	8.2	1.8	4.8	0.3	+ (3)	Y	13660
2	3.9	1.2	3.2	1.5	+ (3)	Y	64370
3	6.0	0.7	2.3	0.5	+ (3)	Y	1000
4	4.9	0.9	0	—	—	Y	260
5	1.7	0.4	0	—	—	N	0

Key: Anaerobically digested sludge: 1. untreated 2. "nonspiked" 100 m³/ha/year, 3. "metal spiked" 100 m³/ha/year, 4. "nonspiked" 300 m³/ha/year, 5. "metal spiked" 300 m³/ha/year. Undigested sludge: 6. "nonspiked" 100 m³/ha/year, 7. "nonspiked" 300 m³/ha/year.

^a Maximum values in set of four replicates.

^b Figures in brackets refer to the number of replicates (out of three) where positive acetvlene reduction activity (ARA) was detected

Table 2. Physicochemical and Biological Data For the Braunschweig Experimental Site

Sample	Total metals (µg/g dry soil)						pH	Organic matter (%)	Extractable nitrate (µg/g dry soil)	Extractable nitrate Sd.
	Zn	Cu	Ni	Cr	Pb	Cd				
"High" pH trial										
1	48	12	6	13	42	0.18	6.8	2.97	30	3
2	90	21	8	15	43	0.36	6.7	3.43	105	14
3	138	38	12	37	64	1.0	6.8	3.17	148	7
4	168	33	11	22	44	0.8	6.3	4.94	1013	97
5	<u>341^a</u>	<u>99</u>	25	98	107	2.7	5.4	4.56	1398	180
6	84	20	6	13	40	0.3	7.0	3.71	83	5
7	198	43	12	24	55	0.6	6.4	4.27	248	62
"Low" pH trial										
1	36	7	5	11	33	0.2	5.8	3.79	68	2
2	77	14	7	13	34	0.4	5.5	4.47	155	17
3	144	36	12	42	55	1.2	5.7	4.08	187	12
4	175	30	11	21	40	0.9	4.9	5.93	1241	163
5	<u>335</u>	<u>93</u>	24	96	107	2.9	4.8	7.20	1337	180

Key: Anaerobically digested sludge 1. untreated 2. "nonspiked" 100 m³/ha/year, 3. "metal spiked" 100 m³/ha/year, 4. "nonspiked" 300 m³/ha/year, 5. "metal spiked" 300 m³/ha/year. Undigested sludge 6. "nonspiked" 100 m³/ha/year, 7. "nonspiked" 300 m³/ha/year.

^a Total metal figures underlined indicate U.K. limit is exceeded.

Příklad:

Table 3 The sensitivity of the non-symbiotic nitrogen fixation (measured as acetylene reduction) for toxicants.

Chemicals	effect	mg/kg	Refer- ences	Chemicals	effect	mg/kg	Refer- ences
ethoprop	NOEC	5	[97]	Zn	EC50	50	[98]
leptophos	NOEC	5		Cu	EC50	20	
chlordane	NOEC	5		Ni	EC50	2.5	
parathion	NOEC	5	[69]	Cd	EC50	3	
telone II	NOEC	5		methylpyrimifos	NOEC	10	[99]
maneb	NOEC	5		alachloron	NOEC	2	[100]

Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - asimilace a immobilizace dusíku

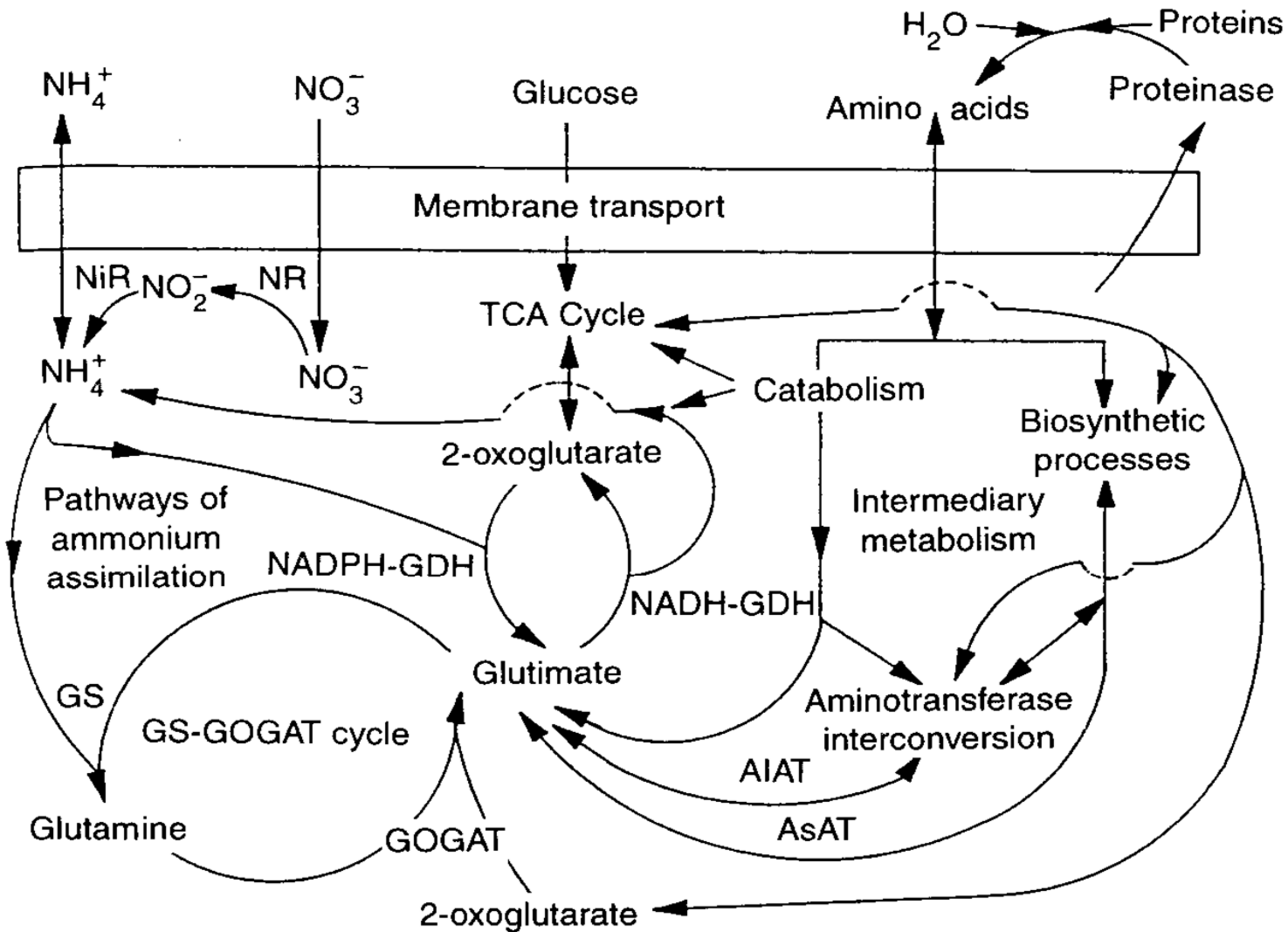
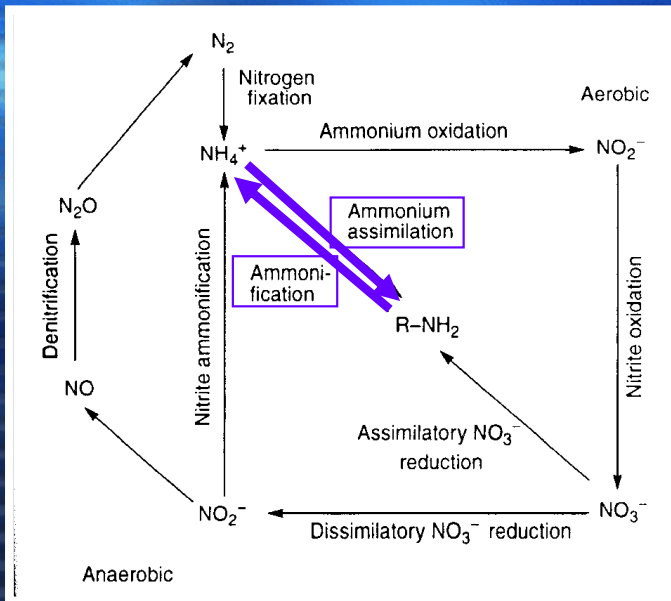


FIGURE 8.2 The major pathways of nitrogen assimilation and mineralization. Abbreviations are: NR, nitrate reductase; NiR, nitrite reductase; NADPH-GDH, NADPH glutamate dehydrogenase; GS, glutamine synthetase; GOGAT, glutamate synthase; AiAT, alanine transferase; AsAT, aspartic transferase; TCA, tricarboxylic acid. (From Ahmad and Helleburt, 1991.)

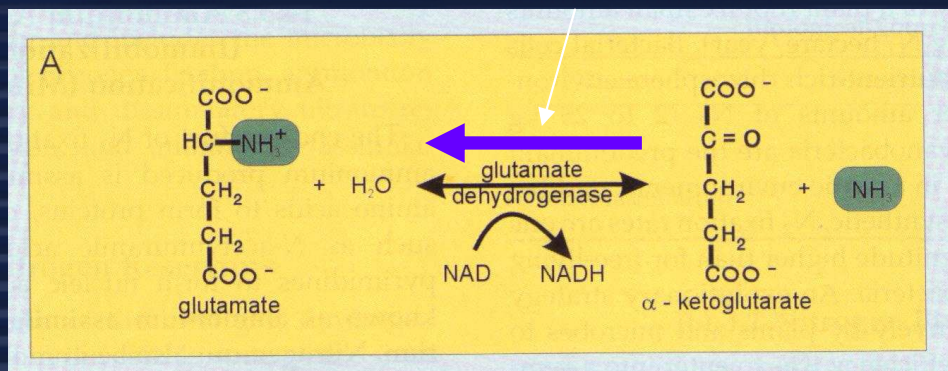
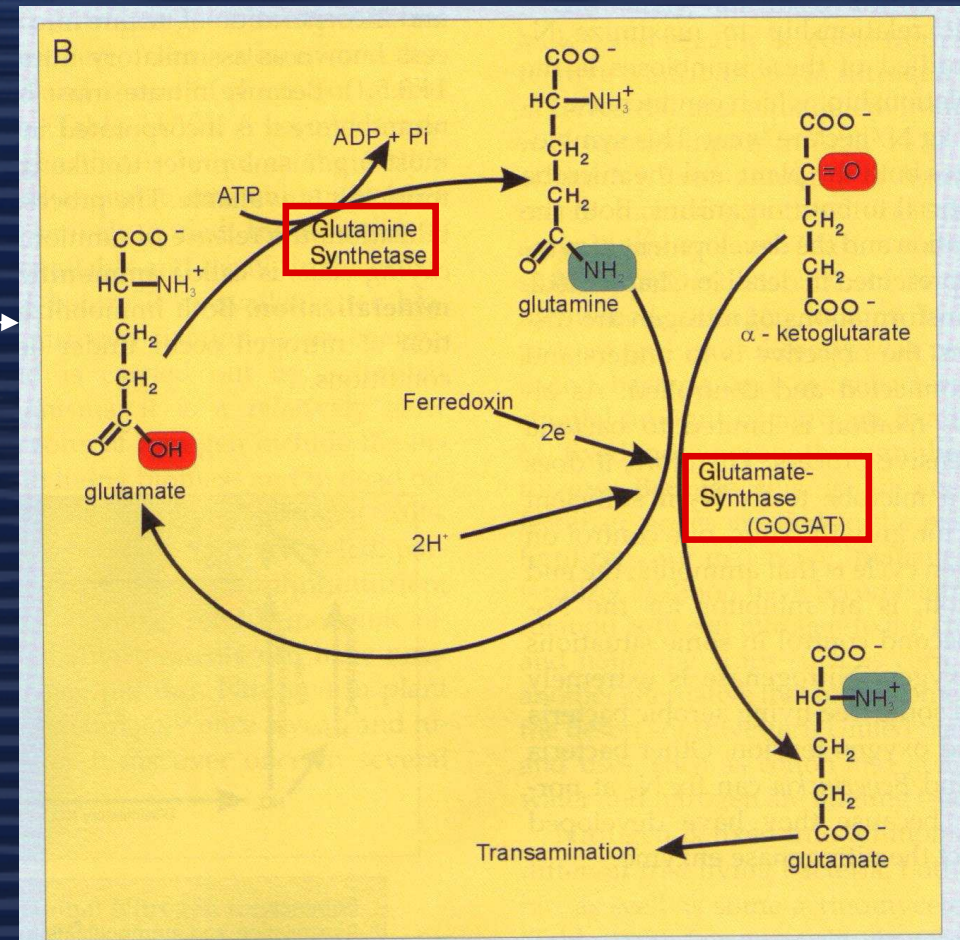
Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - asimilace a immobilizace dusíku



- dusík je uvolňován jako NH_3 z organické hmoty - **AMONIFIKACE**
- NH_3 je asimilován z půdy do živých organismů, velmi dobře jako NH_3 v této formě hlavní zdroj dusíku pro rostliny a mikroorganismy
- kromě toho i asimilační redukce dusičnanů

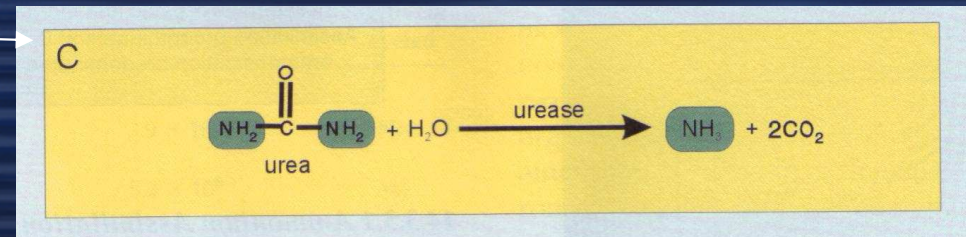
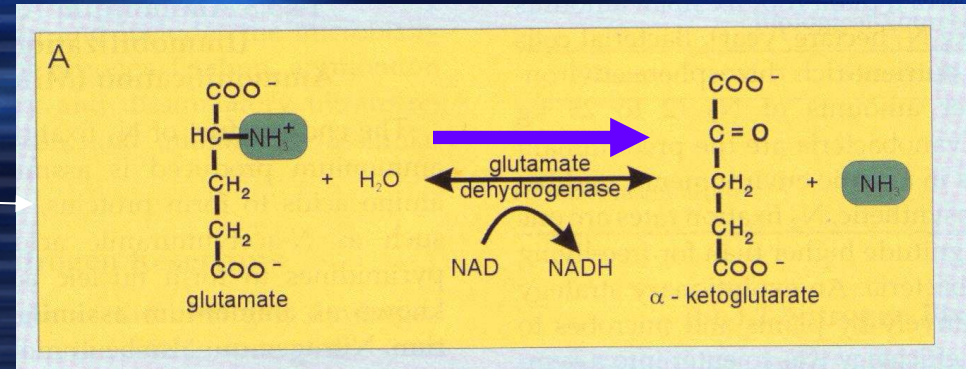
ASIMILACE

- ve většině případů energii spotřebovávající proces asimilace
- v případě vysokých koncentrací ($> 0,5ppm$) dochází k katalytické vazbě do glutamátu



AMONIFIKACE

- proces kdy se NH₃ uvolňuje z glutamátu (uvnitř buněk)
- či proces kdy enzymem ureázou se štěpí močovina
- nebo extracelulární degradace proteázami, lysozomy, nukleázami



Mechanismy:

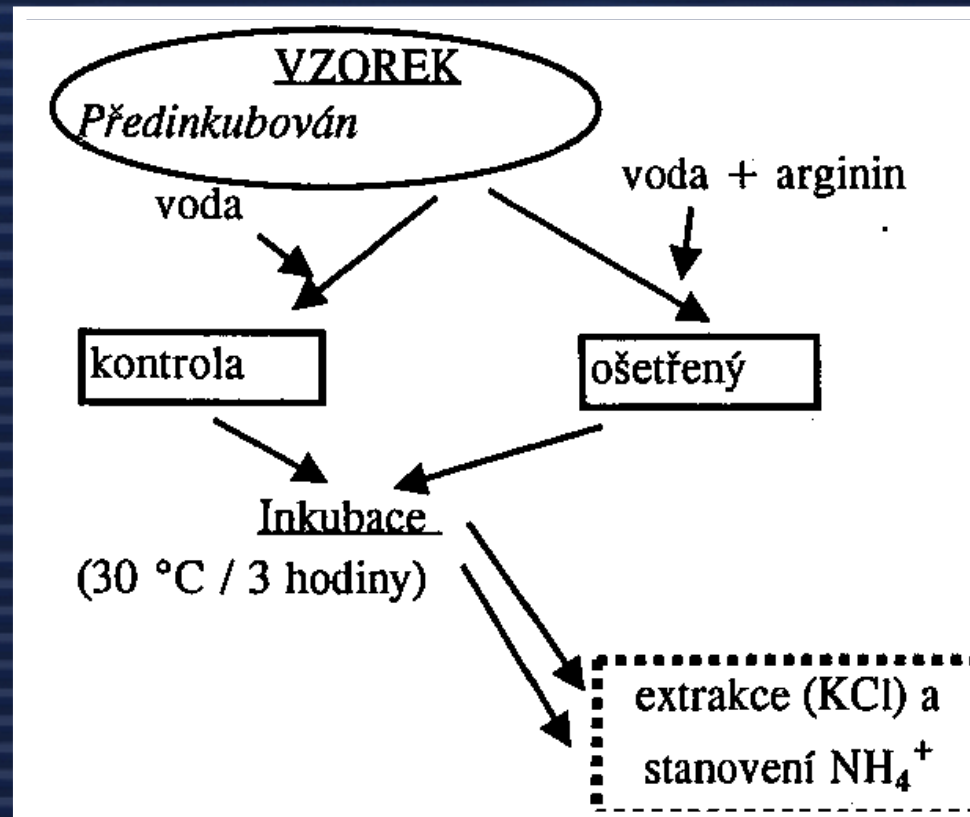
- hydrolytická deaminace: $\text{R-NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-OH} + \text{NH}_3$
- oxidativní deaminace: $\text{R-CHNH}_2\text{-COOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CO-COOH} + 2\text{H}^+ + \text{NH}_3$
- reduktivní deaminace: $\text{R-CHNH}_2\text{-COOH} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{R-CH}_2\text{-COOH} + \text{NH}_3$
- desaturativní deaminace: $\text{R-CH}_2\text{-CHNH}_2\text{-COOH} \rightarrow \text{R-CH=CH-COOH}$
- při poměru C:N < 20 převládá amonifikace
- při C:N > 20 asimilace

Metodicky lze rozlišit amonifikaci jako bazální úroveň mineralizace N - obdoba bazální respirace v cyklu C; a potenciální amonifikaci po přidavku substrátu (argininu) - obdoba potenciální respirace

Měření:

Potenciální amonifikace - test s argininem

- přidavek substrátu (argininu) a stanovení amonných kationtů po 3h inkubace půdy při 30°C
- stanovení amonných iontů se provádí po extrakci 2M KCl (1:4) **spektrofotometricky (ISO 14256)**: při 630 nm se sleduje zabarvení vzniklé reakcí s NaOCl a phenolátem sodným, katalýza nitroprusidem sodným (Berthelotova reakce)
- jinou možností je stanovení **iontově selektivní plynovou elektrodou (ISE)**: amonné ionty se převedou na amoniak při pH 11-13 přidavkem 10M NaOH; potenciál se měří elektrodou, přičemž ke kalibraci se užije roztoků síranu amonného



Měření:

Amonifikace (postup UKZUZ)

- vzorek zatopený vodou je inkubován týden při 40°C
stanovení amonných iontů se provádí po extrakci 1M KCl (1:5) **spektrofotometricky (ISO 14256)**: při 630 nm se sleduje zabarvení vzniklé reakcí s NaOCl a phenolátem sodným, katalýza nitroprusidem sodným (Berthelotova reakce)

jinou možností je stanovení **iontově selektivní plynovou elektrodou (ISE)**: amonné ionty se převedou na amoniak při pH 11-13 přidavkem 10M NaOH; potenciál se měří elektrodou, přičemž ke kalibraci se užije roztoků síranu amonného
- vyjadřuje se jako $\mu\text{g NH}_4^+-\text{N} \cdot \text{g}_{\text{suš.}}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$

Alternativou je měření se značeným dusíkem $^{15}\text{NH}_4^+$

AMONIFIKACE JE SOUČÁSTÍ ŠIRŠÍHO POJMU: MINERALIZACE DUSÍKU NEBOŤ ČÁST NH_3 SE DÁLE OXIDUJE PŘI NITRIFIKACI

- metodicky nelze obě fáze příliš dobře oddělit!!!
- pokud chceme znát skutečnou (ne potenciální) amonifikaci je jedinou možností měření se značeným dusíkem $^{15}\text{NH}_4^+$ či vytvořit anaerobní prostředí zatopením vzorků
- mineralizace N je funkcí teploty, vlhkosti, provzdušnění, typu dusíkatých organických látek v prostředí a také pH
- při procesech vnikají **produkty se zcela jinými environmentálními osudy:**
 - NH_4^+ je stabilní, v půdě se váže na částice koloidů
 - NO_3^- se z půdy rychle vymývá do podpovrchových i povrchových vod; je toxický (methemoglobinémie a nitrosaminy) a způsobuje eutrofizaci a degradaci vodních ekosystémů

Kvůli mobilitě a vyplavování dusičnanů z půd se v zemědělství můžeme setkat s cílenou inhibicí nitrifikačních aktivit !!!

Toto hrozí zejména při hnojení hnojivy obsahující amonné ionty či přímo dusičnany.

Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - mineralizace dusíku

Table 4.1 Representative enzymes involved in N mineralization in soil

Enzyme	EC designation	Action
Proteinases/peptidases	3.4	hydrolyze peptide bonds
trypsin	3.4.21.4	hydrolyzes at Arg, Lys
chymotrypsin	3.4.21.1	hydrolyzes at aromatic amino acids
subtilisin (microbial alkaline proteinase)	3.4.21.14	alkaline proteinase
carboxyl proteinases	3.4.23	acid proteinases similar to pepsin or rennin
microbial metalloproteinases	3.4.24	neutral proteinases containing Zn
Amidohydrolases	3.5.1	hydrolysis C-N bond in linear amides
L-asparaginase	3.5.1.1	hydrolysis of L-asparagine
L-glutaminase	3.5.1.2	hydrolysis of L-glutamine
amidase	3.5.1.4	hydrolysis of aliphatic amides
urease	3.5.1.5	hydrolysis of urea to CO ₂ and NH ₃
peptidoglycan hydrolase	3.5.1.28	hydrolysis of peptidoglycan linkages
Amidinohydrolases	3.5.3	hydrolysis C-N bond of linear amidines
arginase	3.5.3.1	hydrolysis of arginine to ornithine and urea
Transaminases	2.6.1	transfers amine to α-ketoglutarate
Dehydrogenases which deaminate	1.4	
Glutamate dehydrogenase	1.4.1.3	deaminates glutamate
Glycosidases	3.2	important in hydrolysis of amino sugars and their polymers
chitinase	3.2.1.14	hydrolyze chitin linkages
muramidase	3.2.1.17	hydrolyze mucopeptide (peptidoglycan) or mucopolysaccharides
Nucleases	3.1.11-16	degrade DNA and RNA
DNase	3.1.11	exodeoxyribonuclease
RNase	3.1.13	exoribonuclease

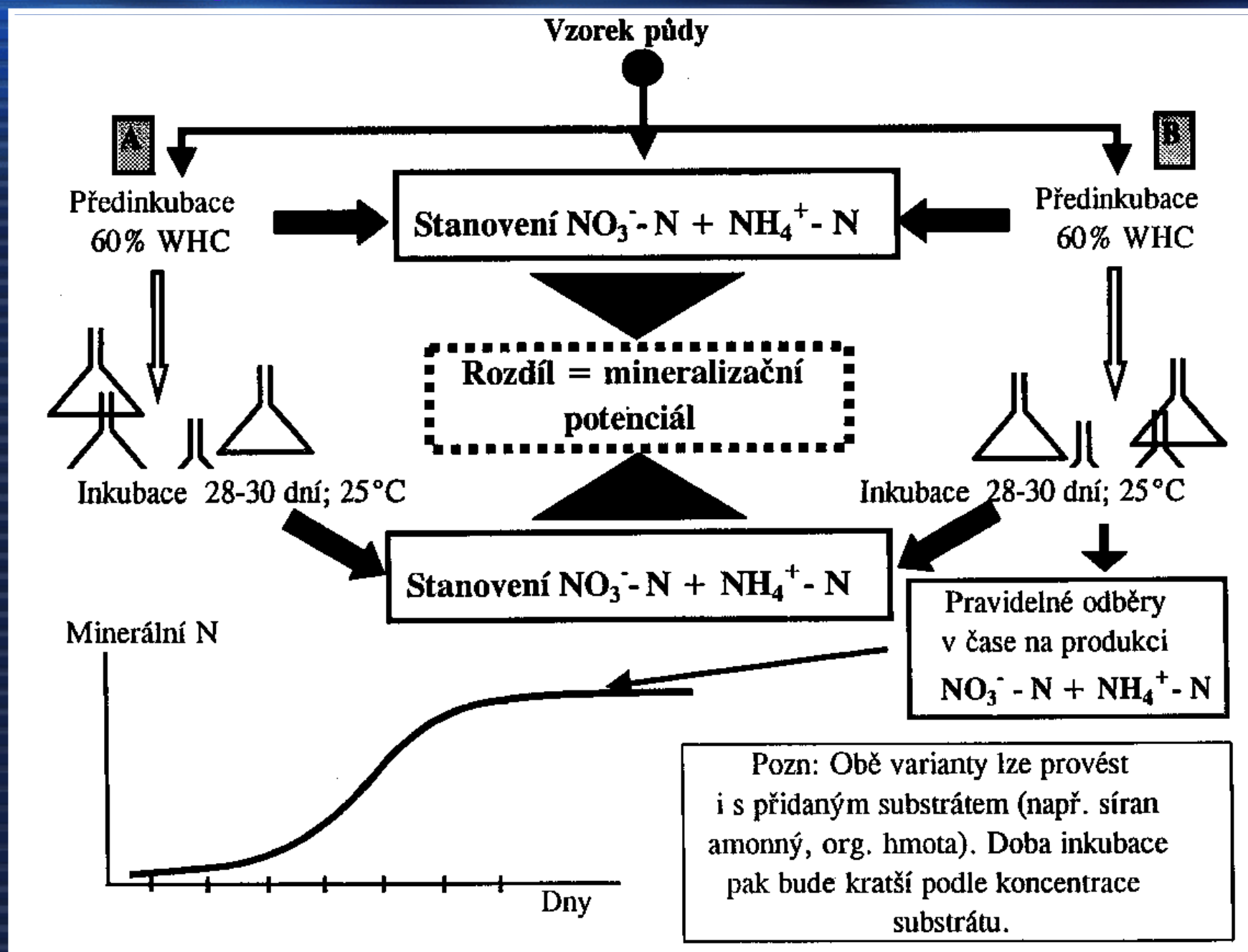
Při stanovení mineralizace dusíku se často spojují oba procesy v tzv. N mineralization potential

- je to vyprodukovaná suma $\text{NH}_4^+ + (\text{NO}_2^-) + \text{NO}_3^-$ v půdě na konci inkubace (extrakce roztokem KCl)
- pokud testujeme vliv chemické látky, dostáváme klasický vztah dávka odpověď s IDs

Stanovení koncentrace dusičnanových a dusitanových aniontů v půdách:

- **dusitany** lze stanovit dle ISO 14256 spektrofotometricky - reakcí s Griess-Ilosvayovým činidlem (sulfanilamid a N-1-naftyl etylendiamin chlorid) tvoří azobarvivo (543 nm)
- **dusičnany** je nejprve nutno redukovat na dusitany (reduktor z kadmia) a pak stejné stanovení
- **dusičnany** lze stanovit UV spektrofotometrií při 210 nm
- **dusičnany** lze stanovit iontově selektivní elektrodou ISE
- v dnešní době existují automatické analyzátoři: FIA - flow injection analyzátor

Měření N mineralization potential



ISO 14238 - Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes

- jak pro stanovení jako parametru kvality půdy
- tak pro testování toxicity látek na N mineralizaci

Test toxicity:

- půda pro test toxicity musí být s Corg 0,5 - 1,5% a nízkým obsahem jílu
- přidává se organický zdroj dusíku - vojtěška (C:N = 16)
- testovaná látka se přidá v cca 5 koncentracích a po 28 denní inkubaci se měří NO_3^-
- výsledkem je procentuální inhibice

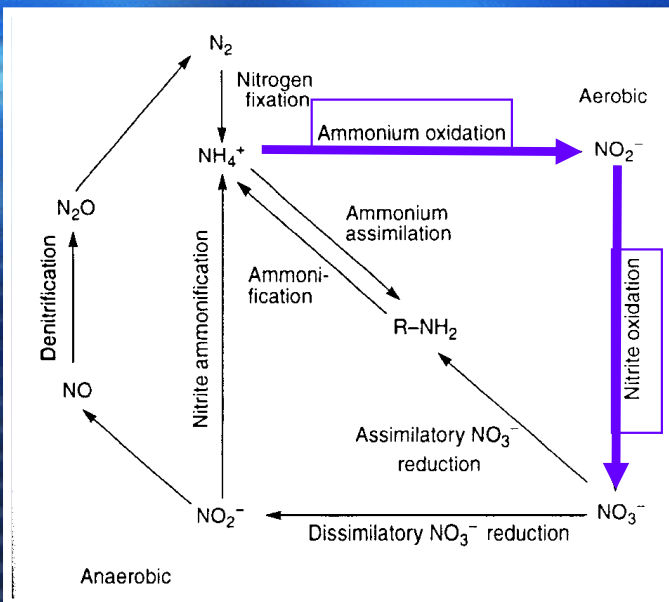
Příklad:

Table 4 The sensitivity of some nitrogen transformations for toxicants

Process	Chemicals	mg/kg	References	Process	Chemicals	mg/kg	References	
N-mineralization	Ag	EC56	540	N-mineralization	Cd	NOEC	336	
			[105]*					[106]
		Hg	EC45	1000		Cd	EC50	1120
		Cu	EC27	320				
		Cd	EC25	560				
		Pb	EC19	1035				
		Mn	EC18	275				
		Fe	EC15	280				
		Zn	EC14	325				
		Ni	EC14	295				
		Sn	EC12	590				
		Cr	EC18	260				
		Fe	EC17	280				
		Al	EC16	135				
	B	EC10	55					
	V	EC12	255					
	Mo	EC27	480					

*The effect of metals (5 mmol/kg) on the nitrogen mineralization in three unamended soils was measured

Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - nitrifikace



- významný, umožňuje mobilitu dusíku v půdě (plus i minus)
Dva kroky:



- oba kroky jsou **striktně aerobní**

-zastává jej jen několik rodů, v půdě první krok např. rod *Nitrosomonas*, *Nitrococcus* a druhý krok např. rod *Nitrobacter*

- *zdrojem uhlíku je pak CO₂*

- enzym pro první krok je **amoniak monooxygenáza (AMO)**, která má širokou substrátovou specifitu a může kometabolicky oxidovat i některé polutanty např. TCE či alkyly až do C₈ – **využití při bioremediacích !!!**

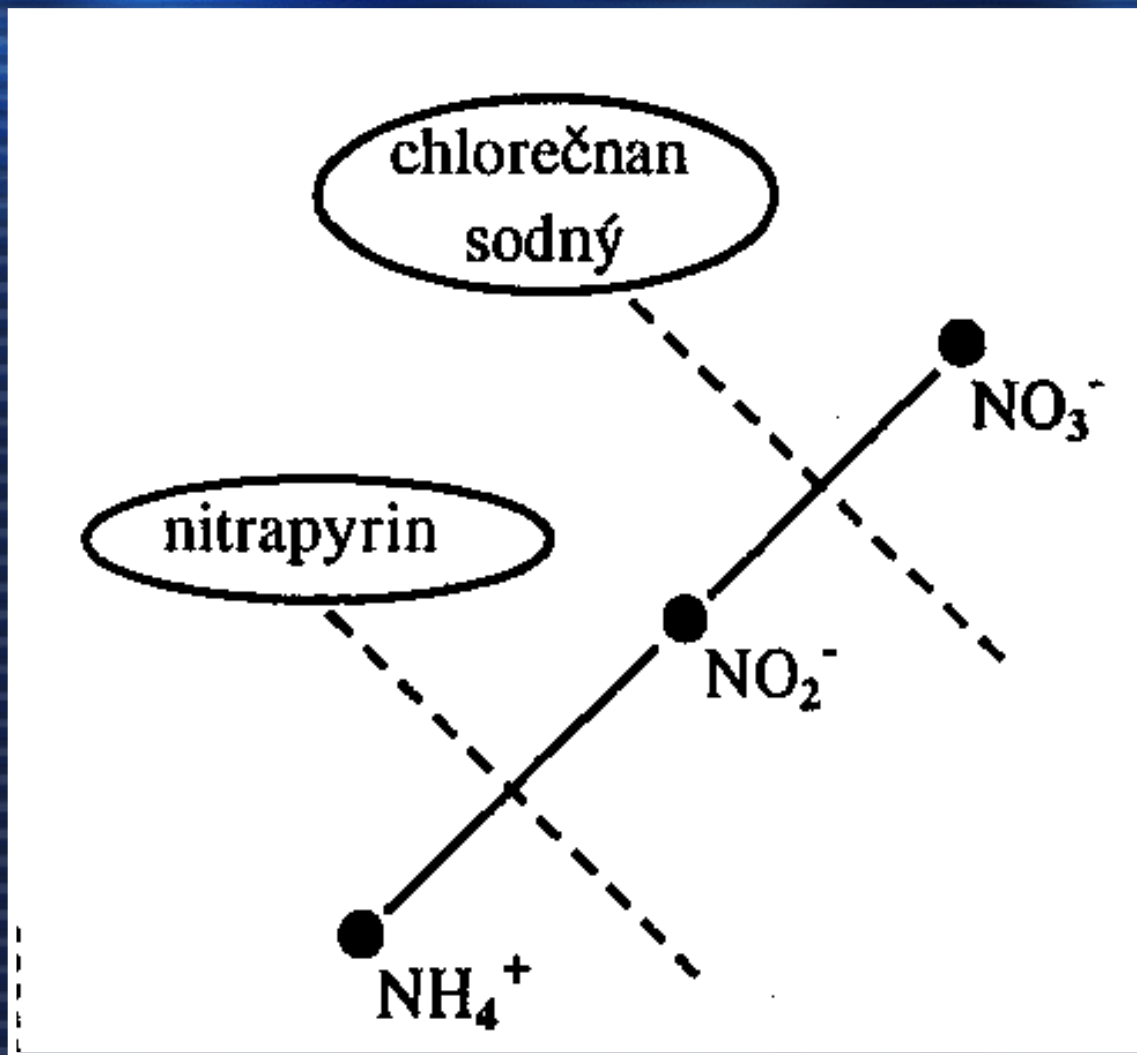
Genus	Species
Ammonium oxidizers	
<i>Nitrosomonas</i>	<i>europaea</i> <i>eutroplus</i> <i>marina</i>
<i>Nitrosococcus</i>	<i>nitrosus</i> <i>mobilis</i> <i>oceanus</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>briensis</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>multiformis</i>
<i>Nitrosovibrio</i>	<i>tenuis</i>
Nitrite oxidizers	
<i>Nitrobacter</i>	<i>winogradskyi</i> <i>hamburgensis</i> <i>vulgaris</i>
<i>Nitrospina</i>	<i>gracilis</i>
<i>Nitrococcus</i>	<i>mobilis</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>marina</i>

Velmi dobrý indikátor stresu, je silně inhibována polutanty - důvody:

- 1) celý systém zisku energie je velmi náročný:** 1. krok potřebuje oxidaci 34 molů amoniaku k fixaci jednoho molu CO_2 , druhý krok dokonce oxidaci 100 molů NO_2^- !!
- 2) dva kroky s přičiněním různých populací,** druhý krok je méně energeticky výtěžný (jen 70kJ/mol!)
pokud kroky navazují, nedochází k negativní kumulaci dusitanů (snižuje pH prostředí, toxický ..) dusitany inhibují první krok !!!
- 3) obecně už tak dost citlivý proces** k environmentálním podmínkám: pH optimum je 6,6 - 8,0; při pH < 4,5 se zastaví

Pozn: existují i mikroorganismy heterotrofní, které provádí nitrifikaci a není známo proč představují minoritní význam ve srovnání s autotrofní nitrifikací

Obě fáze nitrifikace lze metodicky oddělit pomocí inhibitorů



Měření:

- krátkodobá (SNA) či dlouhodobá (LNA)
- většinou preferována SNA, neboť po delší době nastávají změny ve společenstvu

Potenciální nitrifikace (SNA) (NEA - nitrifier enzyme activity) (ammonium oxidation activity)

- testování vlivu chemických látek a indikační parametr pro půdu
- protože čas metody je krátký, nemůže dojít k růstu populace nitrifikátorů a je tedy též odhadem velikosti populace oxidátorů amoniaku
- **SOIL SLURRIES** - půda je inkubována v suspenzi s roztokem chloristanu draselného bez či s (jakoby potenciální nitrifikace) přídávkem saturujícího množství síranu amonného
- po 24 h (bez) či 5 h (s), eventuálně každé 2 hodiny se měří koncentrace NO_2^- , neboť chloristan inhibuje oxidaci na dusičnany
- koncentrace dusitanů se měří po extrakci KCl spektrofotometricky reakcí s sulfanilamid a N-(1-naftyl)-etylendiamonium chloridovým činidlem

ISO/DIS 15685 - Determination of potential nitrification - Rapid test by ammonium oxidation:

- jde o velmi rychlý test vlivu chemikálií na první stupeň nitrifikace
- suspenze s pufrům pH 7,2, síranem amonným a testovanou látkou
- jako referenční látku lze užít nitrapyrin

Měření:

- krátkodobá (SNA) či dlouhodobá (LNA)
- většinou preferována SNA, neboť po delší době nastávají změny ve společenstvu

Nitrifikace (LNA)

Delší inkubace se příliš nedoporučují, neboť mohou probíhat změny společenstva.

ISO 14238 - Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes

- půda inkubována po přidavku 1% síranu amonného; po 1-3 týdnech stanovení zbylého NH_4^+ či vzniklého NO_3^-

- Jelikož se nitrifikace skládá ze dvou nezávislých kroků, je možné teoreticky očekávat některou z následujících možností účinku polutantu na tento proces (citace):
 - a) Látka může toxicky působit na obě fáze procesu, nebo pouze na první krok (jehož produkt je zároveň hlavním zdrojem substrátu pro 2. krok). Tyto případy se projeví úbytkem koncentrace jak dusitanů, tak dusičnanů ve sledované půdě.
 - b) Polutant inhibuje pouze 2. krok nitrifikace. To vede k prodloužení doby zpoždění (lag fázi) produkce dusičnanů a k akumulaci dusitanů v prostředí. Jelikož nadměrné koncentrace dusitanů mohou působit toxicky na obě fáze procesu, konečným důsledkem může být také inhibice nitrifikace jako takové.
 - c) Vzácněji může docházet k stimulaci nitrifikace. Možným vysvětlením je působení toxické látky na jinou složku mikrobiálního společenstva, jehož následkem je odumření většího počtu buněk. Ty jsou pak k dispozici jako substrát umožňující růst nezasaženým organismům a stimulaci nitrifikace zvýšenou dostupností amoniaku.

Příklad:

Používají se jako cílené inhibitory nitrifikace v zemědělství proti ztrátám dusíku z půdy

Table 2 The sensitivity of the nitrification for toxicants.

Chemicals	effect	mg/kg	Refer-ences	Chemicals	effect	mg/kg	Refer-ences
aniline	NOEC	25	[79]	cinmethylin	EC12	50	[80]
4-chloroaniline	NOEC	10		cyanazine	EC95	50	
3-chloroaniline	NOEC	10		dimethazone	EC80	50	
paraquat	EC50	2500	[81]	ethalfluralin	EC90	50	
	EC50	720		metoachlor	EC90	50	
acetylene	EC32	0.1 Pa*	[82]	oryzalin	EC79	50	
propyne	EC40	1 Pa		propachlor	EC97	50	
1-butyne	EC36	1 Pa		acifluorfen	EC10	5	
2-ethylpyridine	EC85	1		diclofop methyl	EC20	5	
phenylacetylene	EC78	1		fenoxyprop methyl	EC20	5	
3-butyne-2-one	EC40	5		fluazifop butyl	EC80	50	
1-phenyl-2-propyn-1-ol	EC40	10		haloxyfop methyl	EC80	50	
1-pentyne	EC30	10		mefluidide	EC63	50	
3-phenyl-2-propyn-1-ol	EC25	10		tridiphane	EC30	5	
4-phenyl-1-butyne	EC21	10		Cu	EC45	320	[83]
diphenyl-acetylene	EC28	10		Cd	EC77	560	
methane	EC50	10 kPa	[84]	Pb	EC14	1035	
ethane	EC50	5 kPa		Zn	EC40	325	
ethylene	EC50	250 Pa		Ni	EC64	295	
acetylene	EC50	0.1 Pa		Cr	EC81	260	
2,4-D	EC10	4	[85]	nitrapyrin	EC44	15	[86]
ethylenethiourea	NOEC	0.1	[87]	2-ethynylpyridine	EC82	15	
nitrapyrin	EC25	30	[69]	4-amino-1,2,4-triazole	EC36	15	
nitrapyrin	EC27	30	[88]				

* For gaseous chemicals the concentrations are expressed in Pascals

Procesy spojené s biochemickým cyklem dusíku - E) denitrifikace

- v anaerobních podmínkách, dusitany a dusičnany slouží jako TEA

Dva typy:

I. dusičnany se redukují na dusitany a dále na amonné ionty- fakultativně anaerobní bakterie (*Escherichia*)

II. $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ - bakterie (pseudomonády ...)

N_2O – skleníkový plyn !!!

Měření: kolorimetrickými technikami, iontově selektivními elektrodami, metodou "acetylene block" (zablokuje N_2O reductázu a N_2O je měřen GC)

Příklad:

Potential Denitrification and Nitrification for Evaluation of Pesticide Effects in Soil

- The acute toxicity effects of 54 pesticides on denitrification and nitrification in soil were studied in the laboratory.
- Potential denitrification activity (**PDA**) was assayed with an acetylene inhibition method (**ARA**), during which the specific growth rate constant of denitrifiers (μ_{PDA}) could also be determined.
- Potential ammonium oxidation activity (**PAO**) was assayed with the chlorate inhibition method.

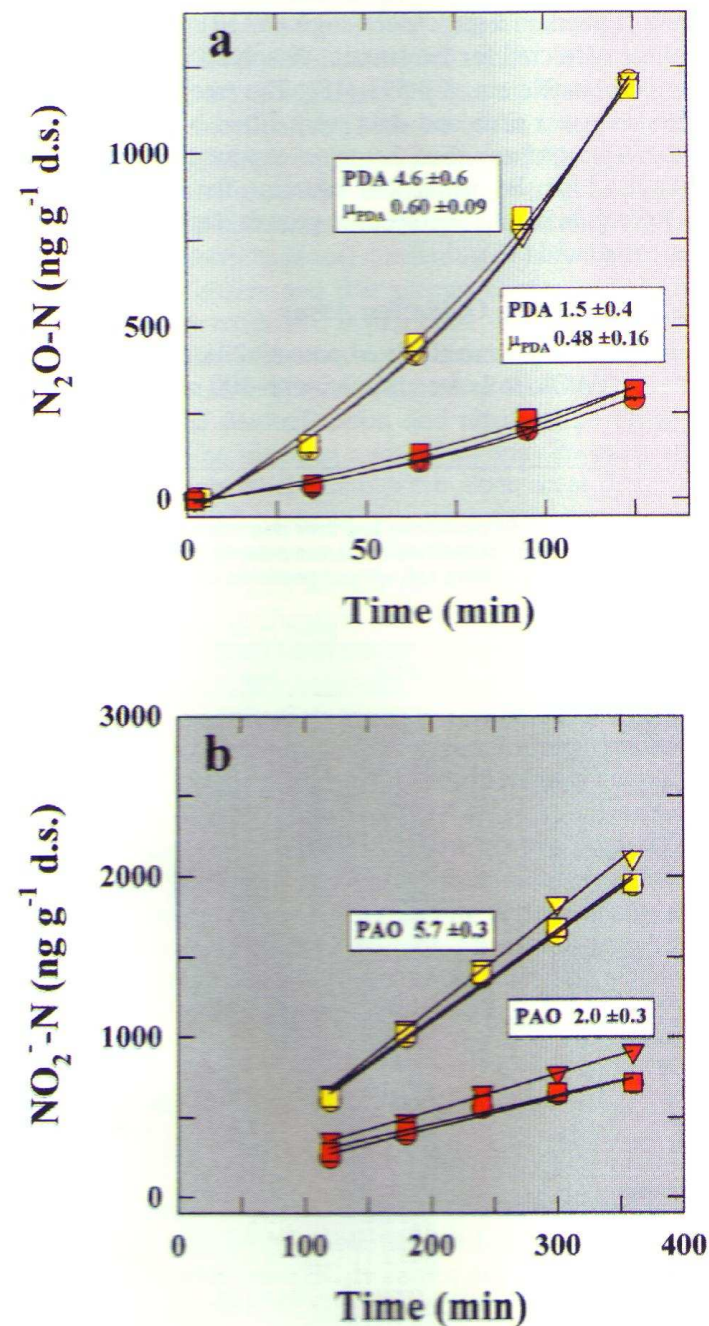


Figure 1. Examples of (a) potential denitrification activity (PDA); and (b) potential ammonium oxidation activity (PAO) patterns in soil without (yellow symbols) and with (red symbols) the addition of 100 μg ioxynil per gram dry soil. The different symbols (\bullet , \blacksquare , \blacktriangle) are three replicates of the same test. (Units given for PDA are $\text{ng N}_2\text{O-N g}^{-1} \text{ dry soil (d.s.) min}^{-1}$ and for μ_{PDA} are hr^{-1} , and units for PAO are $\text{ng NO}_2^- \text{-N g}^{-1} \text{ d.s. min}^{-1}$.)

Příklad:

- In a subsequent dose-response test NOEC, EC50 and EC90 were determined for mancozeb (PDA and PAO) and 2,4-DB, ioxynil, maneb, zineb and nitrapyrin (PAO).

Table 2. Effect concentration levels of some pesticides on potential denitrification activity (PDA) and potential ammonium oxidation activity (PAO) in soil as determined in dose response tests ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil).

Pesticide	NOEC	EC ₅₀	EC ₉₀
<i>PDA</i>			
Mancozeb	1.0	7.1	33.0
<i>PAO</i>			
2,4-DB	3.9	38.0	230.0
ioxynil	30.0	65.0	120.0
Mancozeb	0.6	2.1	6.7
Maneb	0.6	2.3	6.8
Zineb	0.4	3.6	22.0
Nitrapyrin	0.1	0.6	81.0

! relativní hodnoty !

! logaritmičsky
znázorněné koncentrace
testované látky !

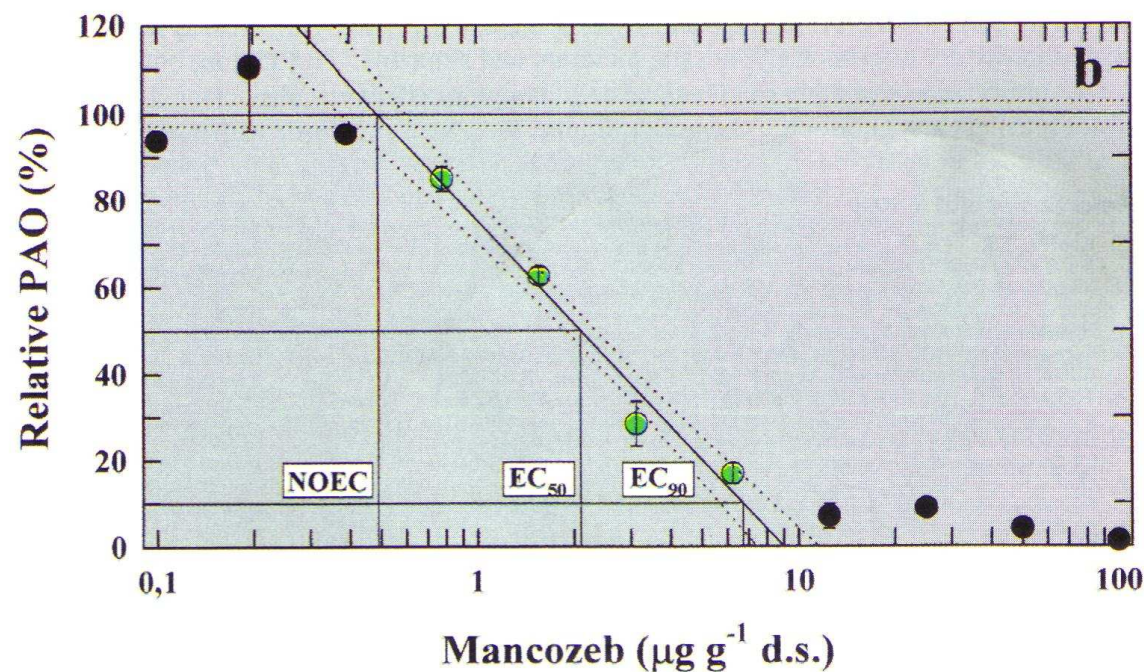
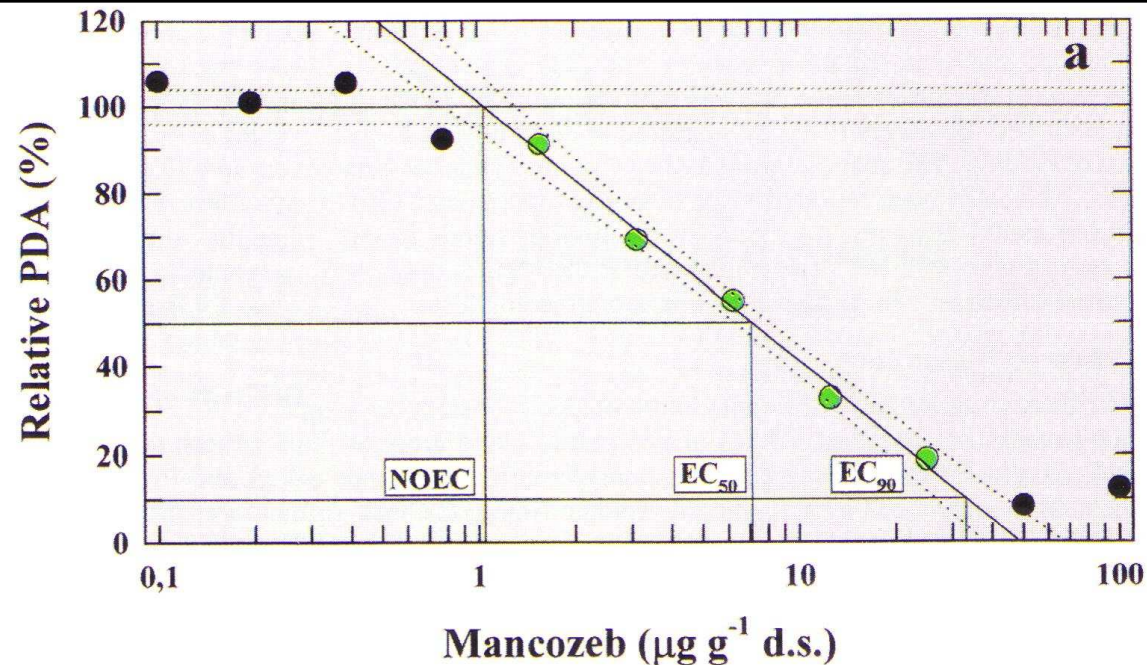


Figure 2. Relative rates of (a) potential denitrification activity; and (b) potential ammonium oxidation activity in soil at different concentrations of mancozeb. Horizontal solid and dotted lines are mean values \pm standard deviations of the control without pesticide ($n = 3$). Slope solid and dotted lines are linear regression lines with 95% confidence limits. Green symbols are rates included in the regression for dose response calculations of NOEC, EC₅₀ and EC₉₀, respectively.

Příklad:

• **Conclusion:** All three parameters are suitable for inclusion in a test system for assessing effects on the soil environment.

Table 1. The effect of 54 pesticides and their degradation products at 100 µg a.i. g⁻¹ dry soil on the potential denitrification activity (PDA), specific growth rate of denitrifiers (µ_{PDA}) and potential ammonium oxidation activity (PAO). Figures given are mean values ± standard deviation (n = 3) in percent of a control soil without pesticide addition.

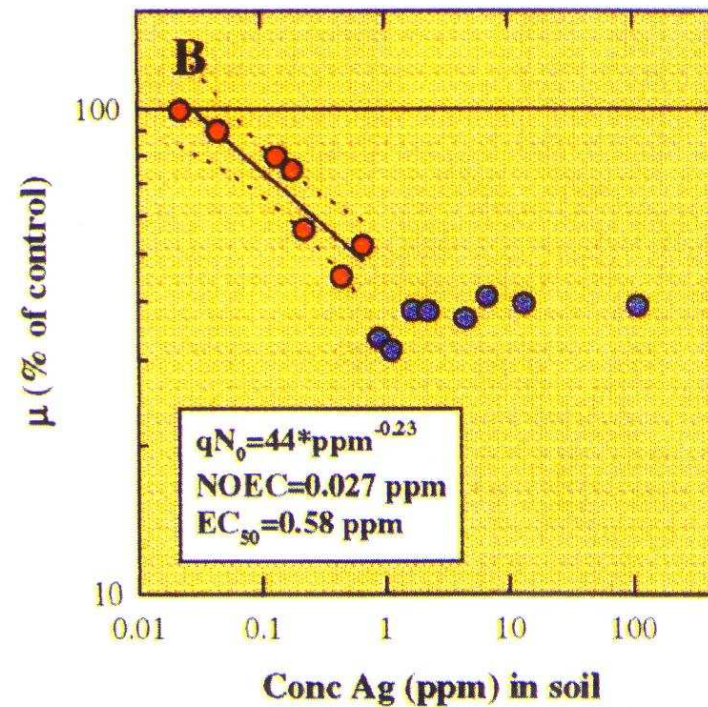
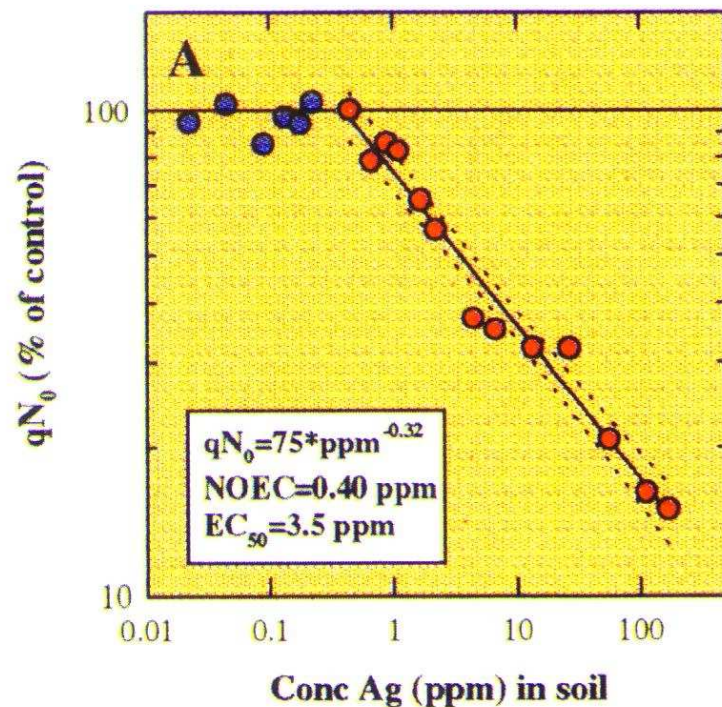
Pesticide	Effect (% of control)			Pesticide	Effect (% of control)		
	PDA	µ _{PDA}	PAO		PDA	µ _{PDA}	PAO
<i>Herbicides</i>							
Alloxydim	111 ± 5	94 ± 6	96 ± 2	MCPB	107 ± 4	69 ± 4*	72 ± 2*
AMPA	135 ± 8*	82 ± 8	n.a.	MCPP	99 ± 6	86 ± 5	90 ± 3
Atrazine	98 ± 5	103 ± 2	n.a.	Metobromuron	103 ± 8	98 ± 12	102 ± 2
Bentazone	97 ± 5	94 ± 11	94 ± 1	Metribuzin	86 ± 4*	120 ± 6*	94 ± 6
Bromacil	101 ± 3	84 ± 7	92 ± 4	Napropamide	101 ± 1	91 ± 2	100 ± 5
Chlorbromuron	102 ± 2	91 ± 5	84 ± 3*	p-Chlorophenoxy acid	101 ± 2	84 ± 2	n.a.
Dalapon-Na	119 ± 16	89 ± 11	99 ± 3	Picloram	117 ± 3	93 ± 2	102 ± 4
2,4-D	112 ± 3*	80 ± 4*	91 ± 0*	Propazine	114 ± 2	109 ± 2	n.a.
2,4-DB	115 ± 2*	82 ± 1*	31 ± 1*	Propyzamide	109 ± 8	105 ± 7	104 ± 14
2,4-DP	115 ± 9	80 ± 5	90 ± 2	Pyrazone	73 ± 3*	121 ± 2	n.a.
2,4-Dichlorphenol	75 ± 1*	55 ± 6*	n.a.	Simazine	97 ± 13	116 ± 13	113 ± 13
Diuron	101 ± 5	94 ± 5	85 ± 7*	TBA	96 ± 6	83 ± 9	83 ± 2*
Glyphosate free acid.	115 ± 7	93 ± 9	96 ± 2	TCA	114 ± 5	91 ± 3	102 ± 5
Glyphosate iso-propylamid	97 ± 7	112 ± 5*	102 ± 2	2,4,5-T	104 ± 3	82 ± 6*	82 ± 4*
Hexazinone	106 ± 2	96 ± 2	105 ± 8	Terbutylazine	99 ± 0	108 ± 7	88 ± 1
Imazapyr	n.a.	n.a.	93 ± 5	Terbutryn	93 ± 3	104 ± 6	81 ± 3*
Ioxynil	31 ± 8*	80 ± 27	35 ± 5*	Tri-allat	97 ± 7	123 ± 1*	90 ± 2
Lenacil	97 ± 2	95 ± 5	97 ± 5	Triclopyr	n.a.	n.a.	88 ± 4*
Linuron	113 ± 1	92 ± 4	81 ± 6*	Trifluralin	96 ± 2	102 ± 5	94 ± 2
MCPA	114 ± 6	73 ± 9	85 ± 3*				
<i>Fungicides</i>							
Benomyl	110 ± 6	73 ± 1*	88 ± 6	Thiophanate-methyl	110 ± 8	96 ± 6	93 ± 7
Carbendazim	92 ± 3*	114 ± 2*	103 ± 5	Triadimefon	72 ± 5*	142 ± 1	81 ± 10*
Iprodione	113 ± 11	96 ± 18	90 ± 5	Triadimenol	99 ± 5	115 ± 3*	91 ± 3*
Mancozeb	6 ± 1*	138 ± 18*	1 ± 0*	Vinclozolin	122 ± 10	94 ± 3	93 ± 4
Maneb	7 ± 4*	204 ± 96	7 ± 1*	Zineb	33 ± 1*	29 ± 1*	4 ± 0*
<i>Insecticides</i>							
Aldrin	96 ± 6	109 ± 6	90 ± 5	Heptachlor	94 ± 4	109 ± 10	110 ± 11
Cyromazine	97 ± 1	104 ± 5	110 ± 4	Permethrin	101 ± 6	103 ± 5	107 ± 9
Fenvalerate	121 ± 6*	88 ± 0*	108 ± 9				

* Significantly different from control in Student's t-test (p < 0.05).

n.a. = not analyzed.

Příklad:

Figure 3. Effects of silver on (A) potential denitrification activity and (B) specific growth rate constant of denitrifying microorganisms. The NOEC- and EC_{50} -values were calculated from the equation in the Figure. Dotted line shows the 95% confidence interval.



Procesy spojené s dalšími biochemickými cykly

- nemají žádné speciální využití v mikrobiální ekotoxikologii
- mohou sloužit jako endpoint v polních studiích i laboratorních pokusech, mikrobiální ekotoxikologie jim však věnuje velmi malou pozornost

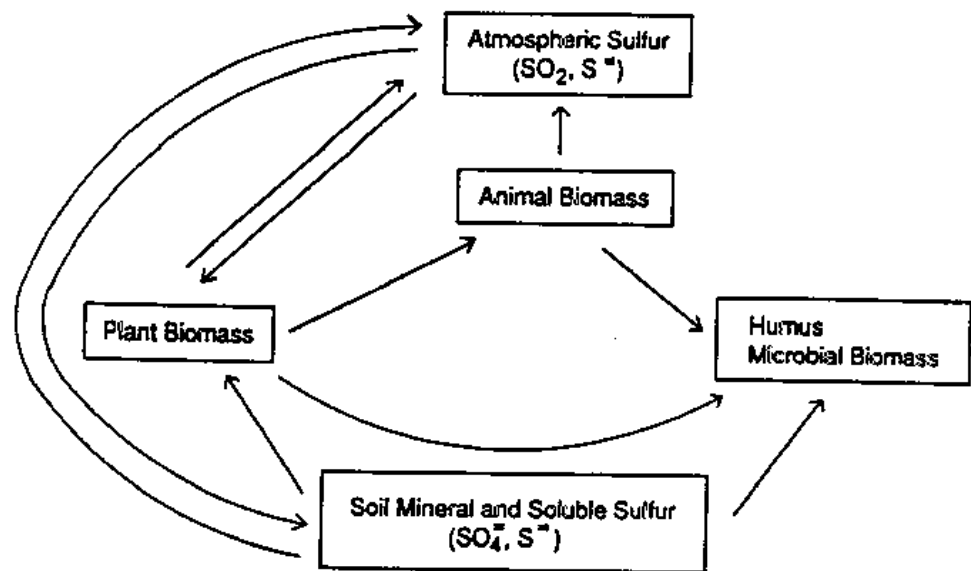


Fig. 9.4 A conceptual model of the sulfur cycle showing generalized interactions of biological resources with soil and atmospheric sources.

Atmosphere

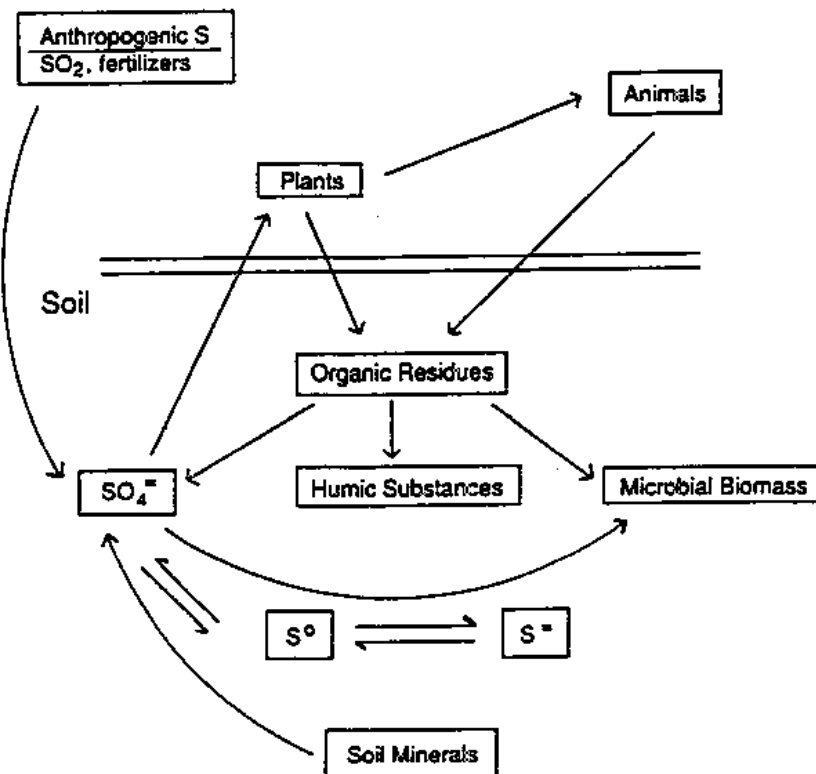


Fig. 15.2 Major features of the sulfur cycle.

3) Sledování enzymatických aktivit

- enzymy jsou jak v buňkách (cytoplazma, periplazma, vnější povrch...), tak v mrtvých, polorozložených buňkách i v extracelulárních komplexech s jíly či huminovými koloidy (v této podobě jsou odolnější proti proteolýze)
- extracelulární enzymovou aktivitu lze odlišit např. po ozáření gama paprsky (inaktivují buňky)

====> opatrnost při interpretacích enzymových aktivit

- podléhají změnám, které jsou při odběru ==> snaha udržet podobné podmínky jako in situ, hlavně teplotu, vlhkost, redox potenciál
- jsou využívány spíše v krátkodobých studiích, aby nedošlo ke změně velikosti společenstva

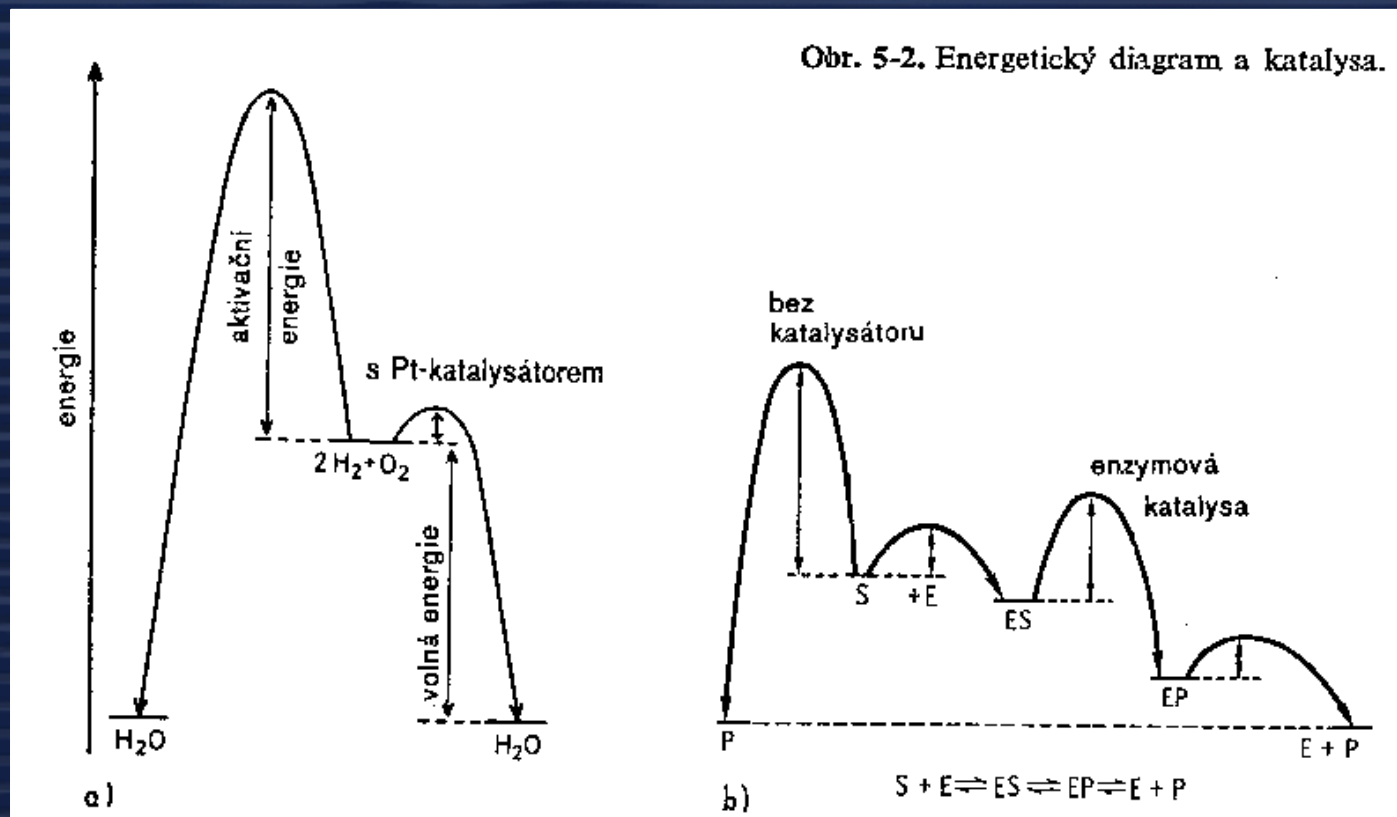
jsou sledovány:

- dehydrogenázy
- proteázy - inkubace s kaseinátovým sodným
- ureázy - inkubace s močovinou
- amidázy
- fosfatázy
- celulózy
- β - galaktozidázy

TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

Enzymové reakce

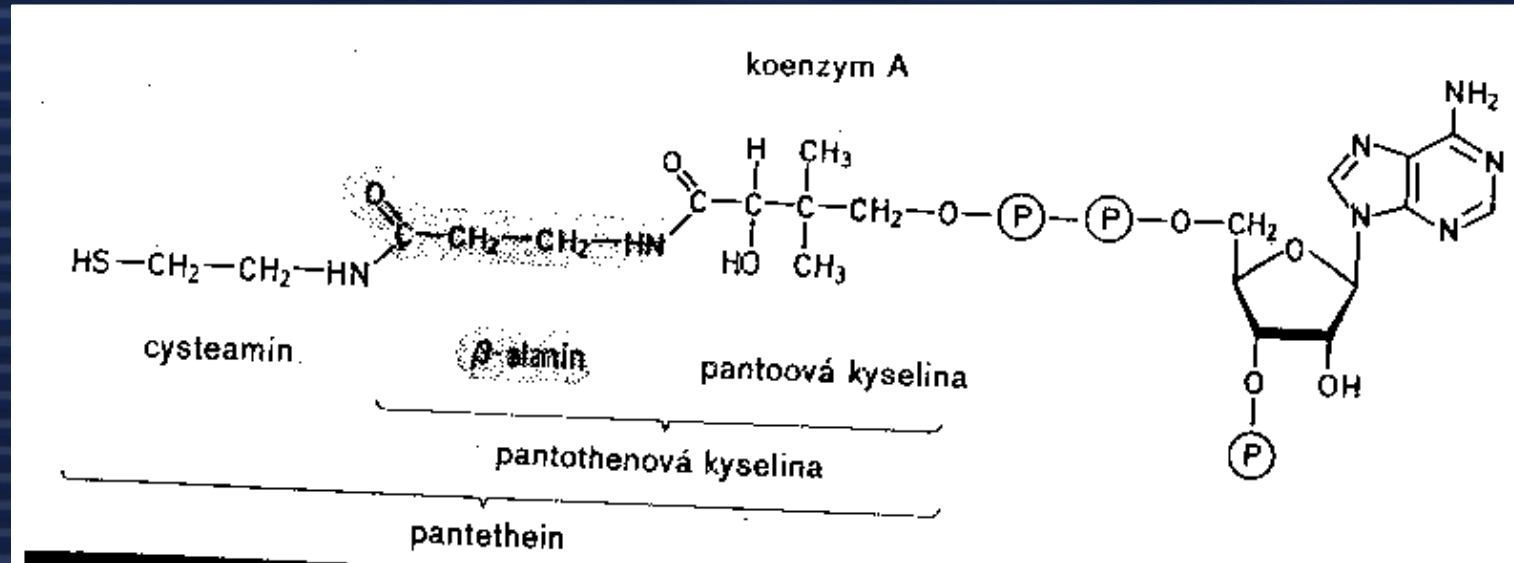
- nemění se energetika reakce (ΔG je konstantní pro danou reakci)
- mění se pouze aktivační energie (snížení)
- nemění se ani rovnováha reakce (ALE rovnováha nemůže konat práci)
- Živé organismy neustále vytváří nerovnováhy a ty konají práci (nutné, aby byly otevřené systémy)



TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

Enzymové reakce

- potřebné jsou koenzymy např. Co-A

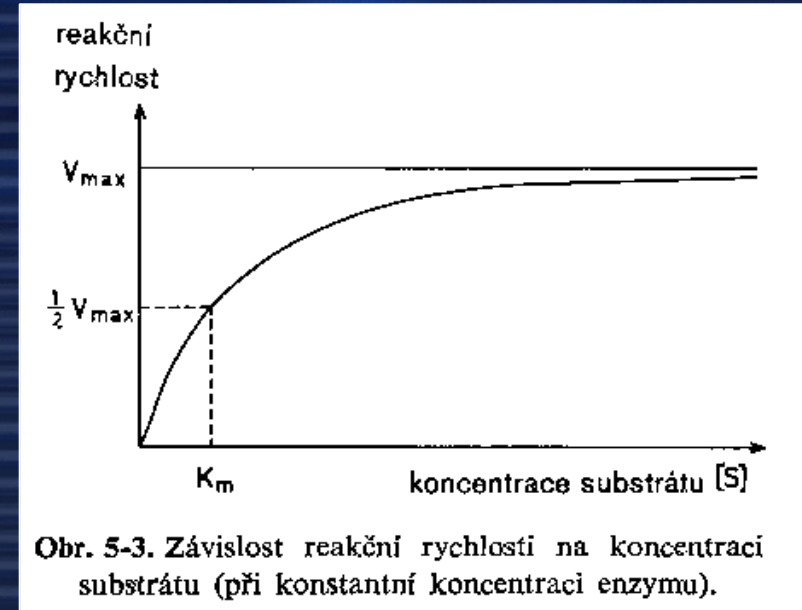


TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

Enzymová kinetika

Michaelis - Mentenová:

- popisuje reakční kinetiku vzniku enzym-substrát komplexu
- vyplývají z toho důležité parametry enzymu, důležité například při biodegradacích



K_m (Michaelisova konstanta)

- parametr substrátu (koncentrace při níž je dosaženo poloviční V_{max} (polovičního nasycení enzymu))
- vysoká značí nízkou afinitu pro daný substrát (průměrně kolem 10^{-2} - 10^{-5} mol/litr)
- výpočet z experimentů a pak z rovnice:

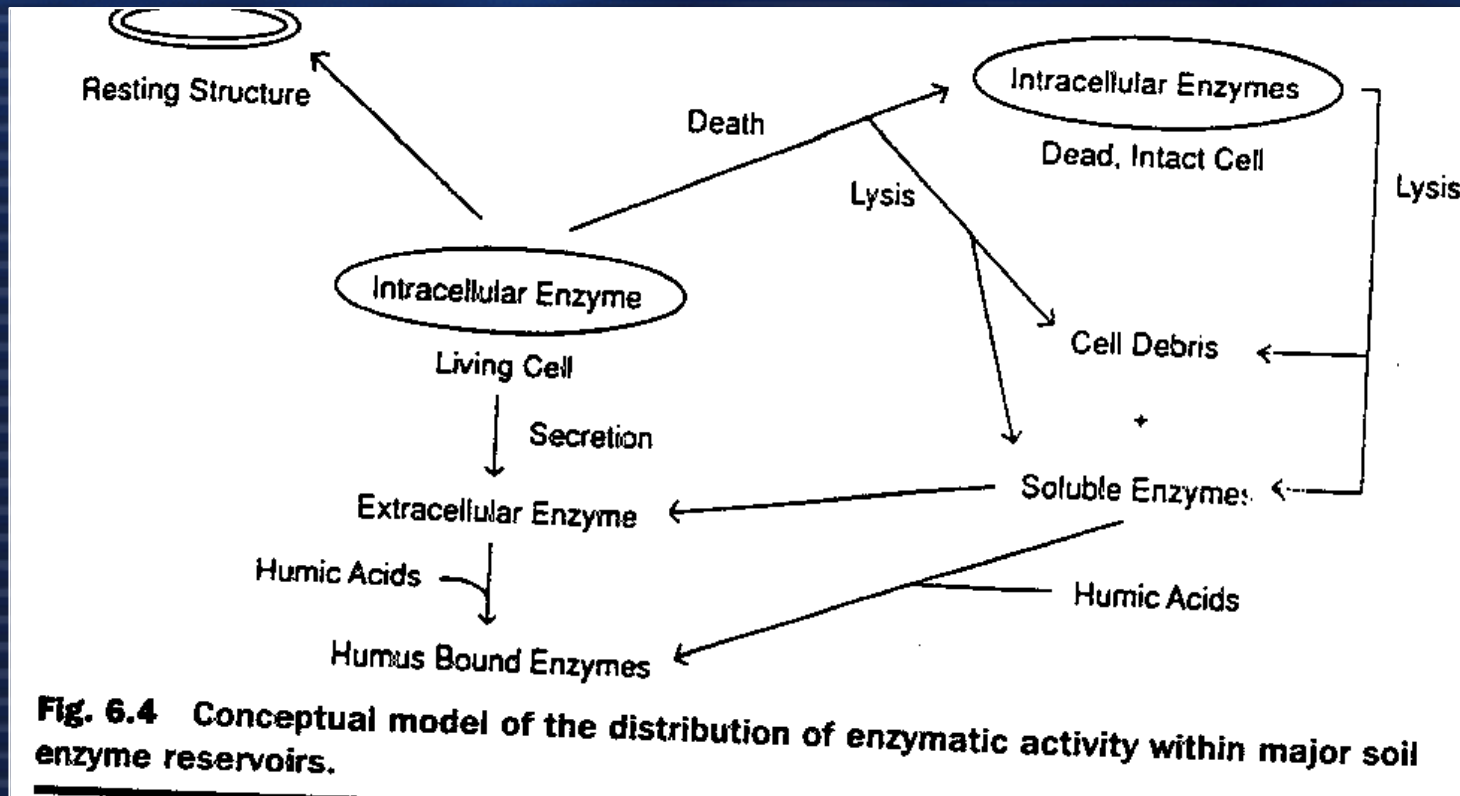
$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

či Lineweaver - Burkeho transformace:

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

Sledování enzymatických aktivit - enzymy v půdě

- obecný princip spočívá v přidavku nadbytku substrátu a sledování jeho úbytku či produkce produktu za současné inhibice růstu mikroorganismů
- měří se enzymatický potenciál či kinetické parametry V_{max}



DOPLNIT DLE TARRADELLAS ET AL. stránky 179 - 206

Sledování enzymatických aktivit

Table 7.14
Some specific enzyme assays

Enzyme	Substrate	Description of assay
Dehydrogenase	Triphenyltetrazolium	Dehydrogenases convert triphenyltetrazolium chloride to triphenylformazan; the triphenylformazan is extracted with methanol and quantitated spectrophotometrically.
Phosphatase	<i>p</i> -Nitrophenol phosphate	Phosphatases convert the <i>p</i> -nitrophenol phosphate to <i>p</i> -nitrophenol, which is extracted in aqueous solution and quantitated spectrophotometrically.
Protease	Gelatin	Gelatin hydrolysis, as an example of proteolytic activity, can be measured by the determination of residual protein.
Amylase	Starch	The amount of residual starch is quantitated spectrophotometrically by the intensity of blue color resulting from its reaction with iodine.
Chitinase	Chitin	Production of reducing sugars is measured using anthrone reagent.
Cellulase	Cellulose	Production of reducing sugars is measured using anthrone reagent.
	Carboxymethyl cellulose	Cellulases alter the viscosity of carboxymethyl cellulose that can be measured.
Nitrogenase	Acetylene	Nitrogenase, besides reducing dinitrogen gas ($N\equiv N$) to ammonia (NH_3), is also capable of reducing acetylene ($HC\equiv CH$) to ethylene (C_2H_2); the rate of formation of ethylene can be monitored using a gas chromatograph with flame ionization detector, and the rate of nitrogen fixation can be calculated using an appropriate conversion factor.
Nitrate reductase	Nitrate	Dissimilatory nitrate reductase can be assayed by the disappearance of nitrate or by measuring the evolution of denitrification products, such as nitrogen gas and nitrous oxide, from samples using a gas chromatograph; denitrification can be blocked at the nitrous oxide level by the addition of acetylene, permitting a simpler assay procedure.

Příklad:

- Particle-size fractionation of a heavy metal polluted soil was performed to study the influence of environmental pollution on microbial community structure, microbial biomass, microbial residues and enzyme activities in microhabitats of a Calcaric Phaeocem.

- In 1987, the soil was experimentally contaminated with four heavy metal loads: (1) uncontaminated controls; (2) light (300 ppm Zn, 100 ppm Cu, 50 ppm Ni, 50 ppm V and 3 ppm Cd); (3) medium; and (4) heavy pollution (two- and threefold the light load, respectively).

- After 10 years of exposure, the fractions also differed with respect to substrate utilization: Urease was located mainly in the <2 mm fraction, alkaline phosphatase and arylsulfatase in the 2–63 μm fraction, and xylanase activity was equally distributed in all fractions.

- Soil enzyme activity was reduced significantly in all fractions subjected to heavy metal pollution in the order arylsulfatase > phosphatase > urease > xylanase.

Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil

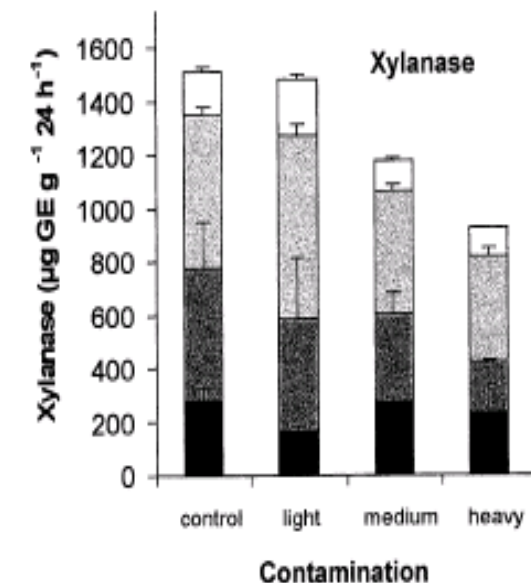
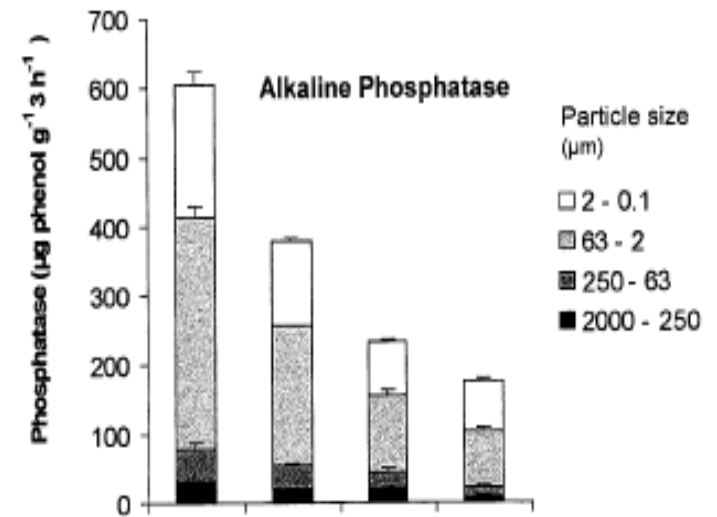
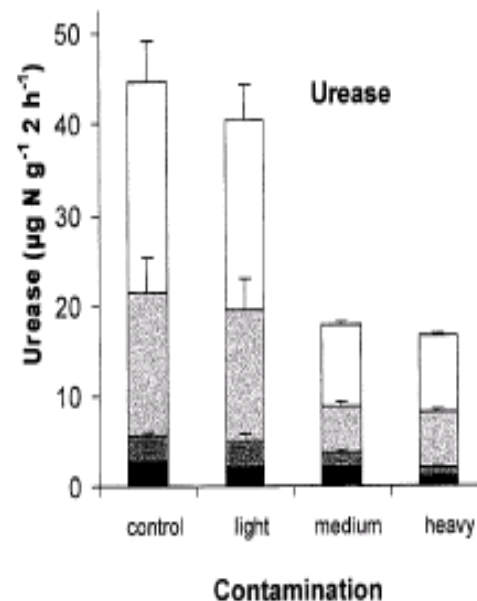


Fig. 1 Effects of heavy metal pollution on the distribution of ninhydrin-reactive N (CFE), alkaline phosphatase, xylanase and urease activity within the particle-size fractions. Data are given as means of three replicate samples, *bars* indicate standard error. Results of xylanase are expressed as µg glucose equivalents (GE) g⁻¹ of the bulk soil

Aktivita dehydrogenázy

- enzym, který z ekotoxikologického hlediska vysoce převažuje všechny ostatní
- oxidace org. substrátu a aerobních podmínkách je spojena s transportem elektronů na membráně a finální akceptaci na O_2 (tento proces spojen se syntézou ATP); zúčastněné $NADPH+H^+$ a $FADH_2$ vznikají pomocí dehydrogenáz (flavoprotein-NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, acyl-CoA dehydrogenase)
- dehydrogenázová aktivita je tedy **mírou celkové mikrobiální aktivity**

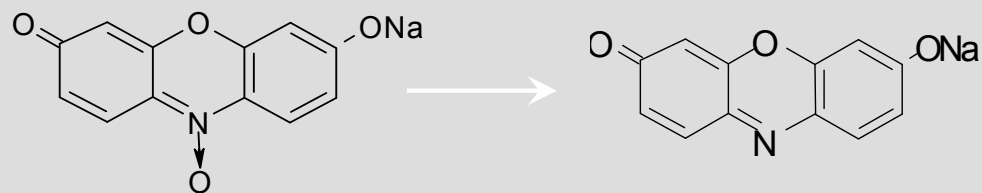
Aktivita dehydrogenázy

Barviva:

TTC (triphenyl-tetrazolium chlorid) ---> TPF (triphenyl formazan)

INT ---> INF

resazurin ---> resorufin



Resazurin

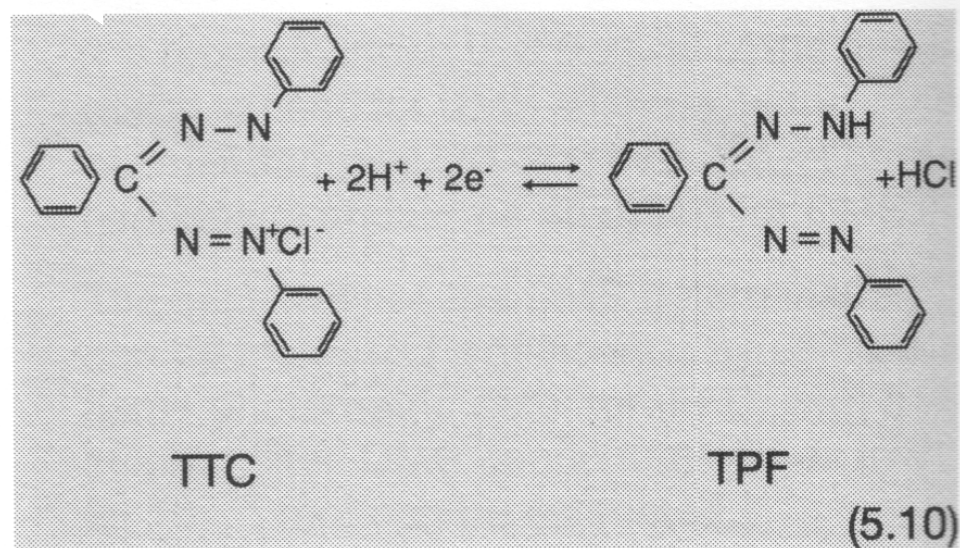
$\lambda_{\max} = 601,2\text{nm}$

modrofialová barva

Resorufin

$\lambda_{\max} = 571,4\text{nm}$

růžová barva

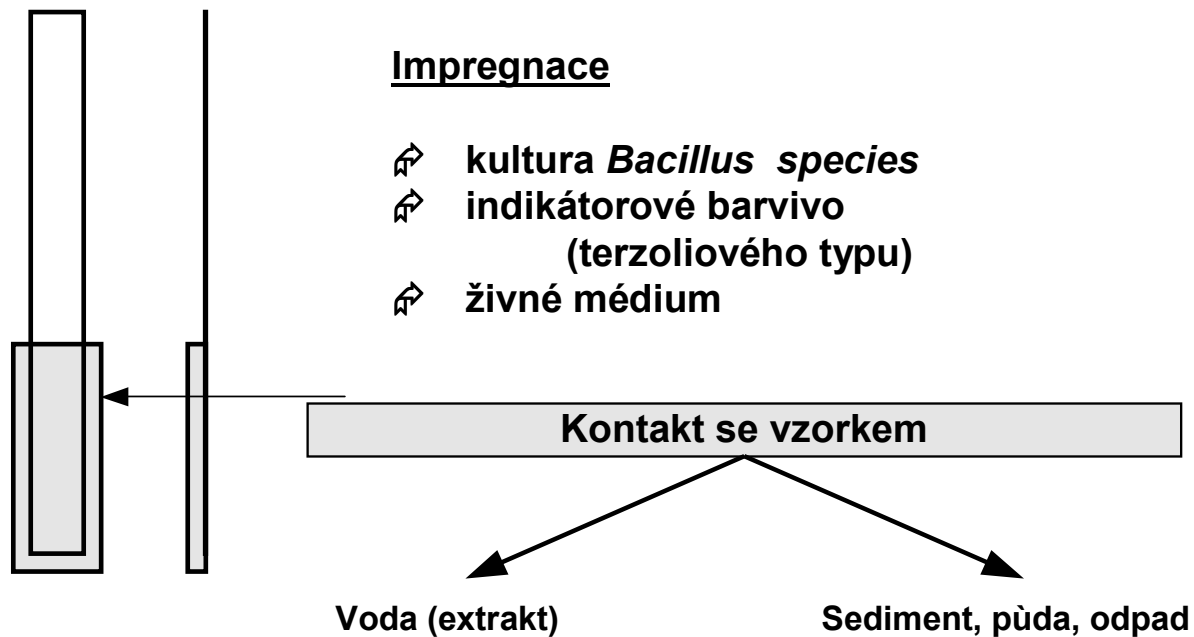


Aktivita dehydrogenázy - kontaktní test

<i>Test na aktivitu dehydrogenáz</i>	
Organismus	<i>Bacillus cereus, G+, (CCM 2010).</i>
Princip	<p><i>Jedná se o test, ve kterém je aplikována sbírková kultura bakterie <i>Bacillus cereus</i> přímo do vzorku pevného skupenství a její poškození se sleduje pomocí spektrofotometrického měření změn v množství specifického substrátu resazurinu (601nm), jehož redukce je úměrná změnám v aktivitě dehydrogenáz sledované buněk.</i></p> <p><i>Alternativou odečtu výsledků je spektrofotometrická detekce vznikajícího resorufinu (571nm). (Rönnpagel et al. 1995).</i></p>
Reakční směs (V)	<i>6 ml.</i>
Předkultivace	<i>18 hodin při kontinuálním třepání (220 rpm) při teplotě 21 °C, (OD₆₀₁=0,4).</i>
Trvání testu	<i>4 hodiny.</i>
Teplota	<i>21 °C.</i>
Třepání	<i>Kontinuální třepání 70 rpm.</i>
Aseptická práce	<i>Pouze při práci se zásobní kulturou.</i>
Výhody	<p><i>Bezextrakční test matrice pevného skupenství. Tato metoda testuje účinky i těch kontaminantů, které jsou vázané na povrch pevných částíček půd a sedimentů.</i></p> <p><i>Výhodou je jeho metodická „benevolentnost“ k přítomnosti kyslíku a dobrá rozpustnost resorufinu ve vodě a tím jeho jednoduchá extrahovatelnost.</i></p>

Aktivita dehydrogenázy - indikátorové papírky

ECHA BIOCID Monitor



10 s kontakt se vzorkem

18 - 24 hodin inkubace (dle typu použité bakterie) 35-37 °C



Aktivita dehydrogenázy - indikátorové papírky

ECHA Biocide Monitor II.

Organismus	<i>Bakterie – rodu Bacillus (G+).</i>
Princip	<i>Test je založen na použití malého absorpčního papírku, který je impregnován testovacím organismem a indikátorovým barvivem bakteriálního růstu (tetrazoliová sůl). Barvivo se redukuje v závislosti na koncentraci dehydrogenáz, které produkují přítomné bakterie. Vyvinutá barva se interpretuje podle přiložené stupnice: toxický vzorek - bílá, růžová nebo tečkovaná - jako mírně toxický, červená - netoxický, (Dutka a Gorrie 1989).</i>
Trvání testu	<i>Kontakt systému se vzorkem 10 sekund + 18-24 hodinová kultivace až do vytvoření barvy na proužku s kontrolním vzorkem.</i>
Teplota	<i>35 – 37 °C.</i>

4) Měření bioluminiscence u prokaryot

Ideální modelový systém pro testování toxických vlivů

- proces spojený s oxidoredukčními pochody, kdy je chemická energie redukované molekuly transformována v energii světelného kvanta

Základní komponenty zapojené v procesu:

- Bakteriální luciferáza - membránový enzym, bez prostetické skupiny; druhově specifická
- Víceuhlíkatý alifatický aldehyd RCHO - molekula oxidovaná v průběhu procesu molekulárním kyslíkem za účasti FMNH₂

Jde o proces silně exergonický, kdy je vyzářeno asi 0,1 světelných kvant na 1 molekulu spotřebovaného substrátu. U světla o vlnové délce 500 nm jde o energii 210 kJ/mol fotonů, což odpovídá 6 molekulám ATP na jeden foton. Při kvantovém výtěžku 0,1 jde o spotřebu 60 molekul ATP na jeden vyzářený foton!!!

Plně svítící bakterie vyzáří mezi 10³ - 10⁵ fotonů za sekundu, což představuje výraznou energetickou zátěž (většina energie se věnuje svícení).

====> Už tak jsou tyto bakterie dosti zatížené, proto jsou velmi citlivým systémem na jakýkoliv další stres.

Biosensors and contaminated land assessment

- Traditional approach
 - Harsh solvent extractions
 - Identification of pollutants
 - Total concentrations
 - Expensive and time consuming
 - Limited information

Biosensors and contaminated land assessment

- Newer approaches
 - Characterisation of the bioavailable fraction
 - Less aggressive extractions
 - Biosensors

Biosensors??

- Biological indicator (microbial cell)
 - Cheaper
 - Simple to use
- Interacts with bioavailable fraction

Biosensor

Receptor

+

Transducer

+

Processor

Microbial cell

+

Bioluminescence

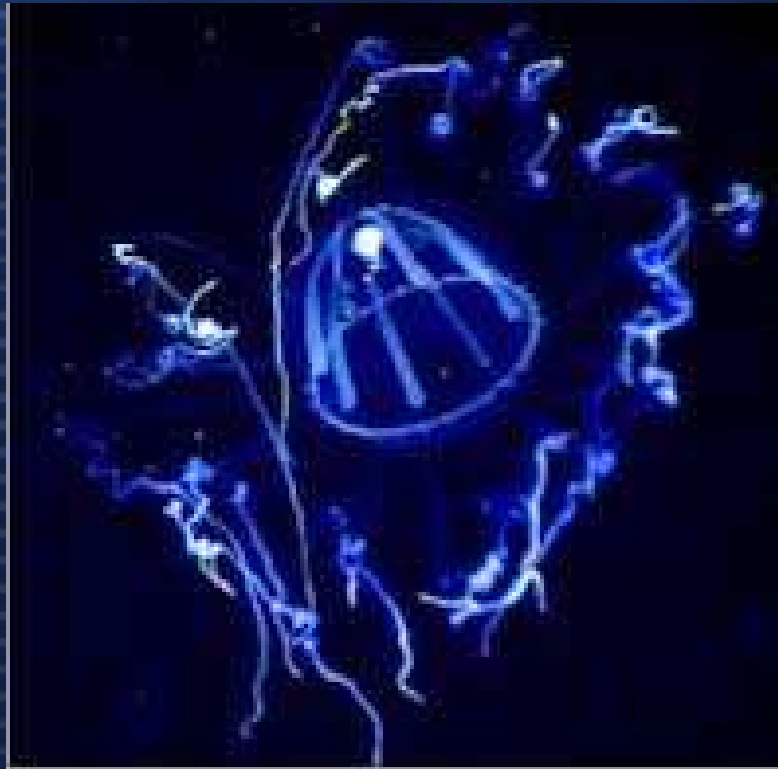
+

Luminometer

Bioluminescence

- Biological emission of visible light
- Occurs naturally
 - Fish
 - Fire flies
 - Bacteria – *Vibrio fischeri*
- Development of microbial assays

Microbial biosensors use bioluminescence- living light



Colobonema



Applications

- Lux activity is O₂ dependant
 - O₂ biosensor
- Microtox® assay (*Vibrio* and *Photobacterium*)
 - Determination of toxicity
 - Developed for water industry
 - Soils?

 - Alternative to larger organisms

lux Biosensors



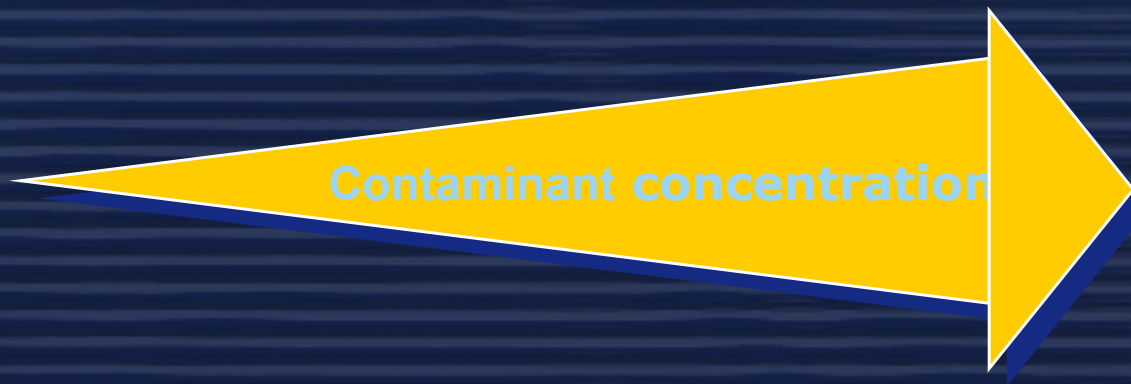
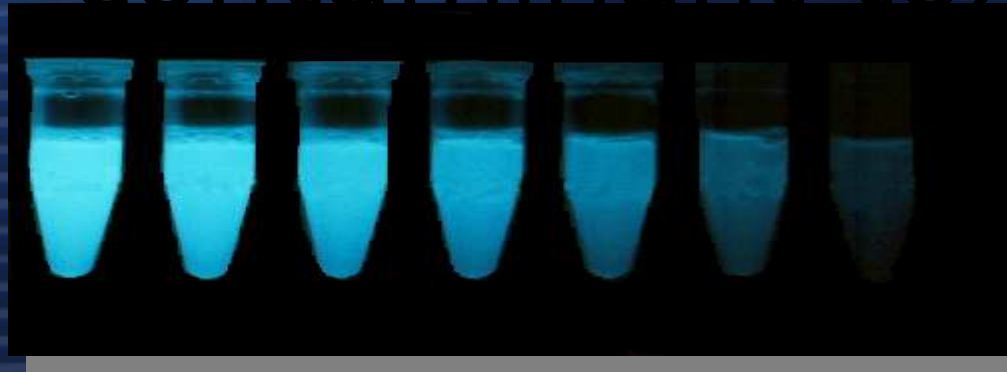
Application of biosensor technology

- biosensors have been developed by introducing bioluminescence into microbes which nature uses to clean up pollution



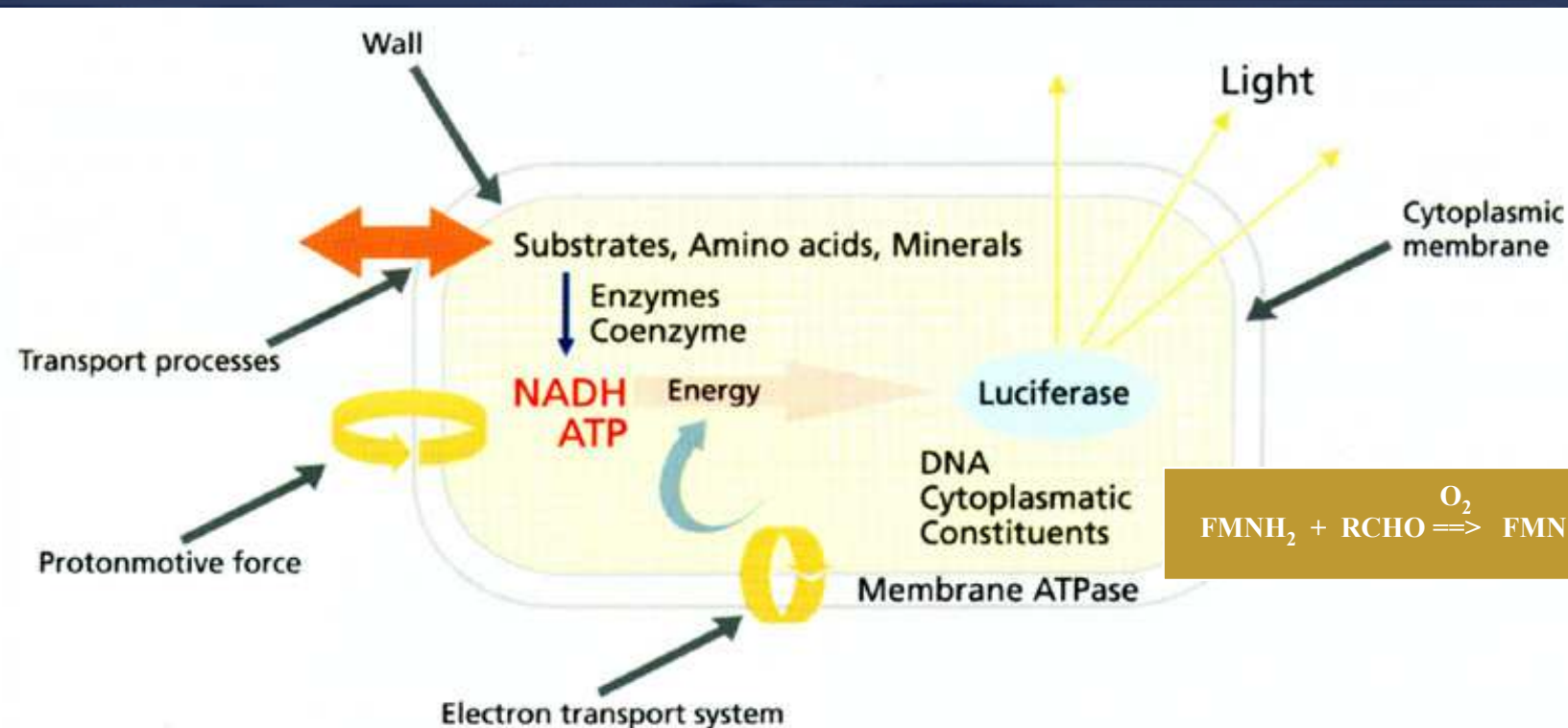
- biosensors can directly diagnose site contamination and prospects for clean-up, underpinning current legislation

Bioluminescence response- directly assesses contaminant toxicity



Měření bioluminiscence u prokaryot

- bioluminiscence může spotřebovat až 1/4 celkově přijatého kyslíku
- v podstatě jde o boční větev toku elektronů ve flavoproteidové části aerobního respiračního řetězce
- příčina: luciferázový systém má větší afinitu ke kyslíku než respirační systém
- při nedostatku O₂ poklesne respirační aktivita až na 10 % normálu, aniž by se pozastavila bioluminiscence; při intenzivním růstu (nedostatek ATP, NADH₂) intenzita luminiscence klesá nebo dokonce mizí



Měření bioluminiscence u prokaryot

- bioluminiscence může spotřebovat až 1/4 celkově přijatého kyslíku
- v podstatě jde o boční větev toku elektronů ve flavoproteidové části aerobního respiračního řetězce
- příčina: luciferázový systém má větší afinitu ke kyslíku než respirační systém
- při nedostatku O_2 poklesne respirační aktivita až na 10 % normálu, aniž by se pozastavila bioluminiscence
- při intenzivním růstu (nedostatek ATP, $NADH_2$) intenzita luminiscence klesá nebo dokonce mizí

Využití - MICROTOX test:

- nejpoužívanější bakteriální test toxicity
- "svítící" bakterie *Vibrio fischeri* je velmi citlivá zejména vůči akutně toxickým látkám
- dobře reprodukovatelný test (koeficient variance 3 -15%)

Měření bioluminiscence u prokaryot - MICROTOX test

ISO 11348-1:1998 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 11348-2:1998 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 11348-3:1998 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

ČSN EN ISO 11348-(1)

Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi (leden 2000)

ČSN EN ISO 11348-2

Jakost vod - Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (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 *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenčních bakteriích) - Část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi

Měření bioluminiscence u prokaryot - MICROTOX test

Microtox

Organismus

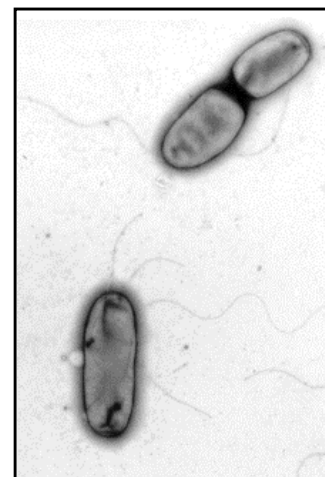
Vibrio fischeri (G-)

Princip

Jsou to testy na mořské luminiscenční bakterii *Vibrio fischeri* (ISO 11348 1998). Po proběhlé expozici je měřeným parametrem inhibice bioluminiscence. Kinetika inhibice je nejčastěji sledována v následujících expozičních intervalech: 5, 15 a 30 minut s použitím jemné ředící řady vzorku 1:1.

Vzorky by měly být před měřením upravovány: pH, salinita (2 %). Je-li hodnota pH v rozmezí od 6 - 8,5, není nutné pH upravovat (BioOrbit 1996).

Při úpravě pH je nutné citlivě připravit roztok HCl či NaOH o takové koncentraci, která optimálně upraví pH roztoku co nejmenším objemem – tím lze zabránit nežádoucímu naředění vzorku. Celý test probíhá při teplotě 15 °C. Test má také variantu “solid phase”.



Reakční směs (V)

1 ml. Poměr vzorek:inokulum je 500:500 µl, případně i 800:200 µl.

Předkultivace

10 – 15 minutová resuscitace lyofilizované bakterie (15 °C).

Trvání testu

5, 10, 15, 20, 30 minut. Sleduje se jen jeden endpoint, nebo kinetická odpověď bakterie v několika zvolených intervalech.

Teplota

15 °C.

pH

Optimum 6 – 8,5 pH.

Třepání

Ne.

Pozitivní kontrola

ZnSO₄.

Aseptická práce

Není nutná.

5) Analýza ATP - integrující ukazatel fyziologické aktivity

Tento ukazatel je ve velice úzkém vztahu k intenzitě metabolické obměny (tzv. metabolický „turnover“)

Obměna bílkovin:

- degradace a resyntéza: nitrobuněčné proteázy
- aktivní v nerostoucích buňkách - obměna 3 - 7% / hodinu

Obměna RNA:

- není vyvážená, převažuje degradace, degradace rRNA souvisí s úbytkem ribozómů

Obměna peptidoglykanu:

- vmezeřování podjednotek u rostoucích buněk, v klidových buňkách se zastavuje

Důležité je také to, že v mrtvých buňkách je ATP rychle degradováno ==> může sloužit jako míra biomasy

Degradační a syntetické pochody jsou vzájemně různě vyvážené podle toho, zda buňka roste, je v klidovém stavu nebo je stresována vnějším faktorem.

Pro klidovou a nerostoucí buňku je též charakteristický pokles vnitrobuněčné koncentrace ATP, ADP a AMP (tzv. „energy charge“)

Analýza ATP - metodika

- po extrakci princip spočívá v použití luciferázy, enzymu katalyzujícího aktivaci D-luciferinu adenosintrifosfátem a následující oxidaci na excitovaný oxyluciferin
- excitovaný oxyluciferin při návratu vyzáří světelná kvanta (luminometr, vytvoření kalibrační přímky)



- velmi citlivá metoda (10^{-11} M koncentrace ATP)

Problémy:

- kvantitativní extrakce ATP (např. z půdy)
- musí být inaktivovány ATPázy a kinázy
- ATP se sorbuje na koloidy
- různé ionty v extraktu inhibují luciferázu
- ATP se vyextrahuje i z rostlinných a živočišných buněk
- možná inhibice luciferázy extrakčním činidlem - nutné ředění (TCA) nebo neutralizace (benzethonium chloridem, H_2SO_4)

==> existuje řada extrakčních metod s výhodami i nevýhodami

- 1) trichloroctovou kyselinou (TCA-phosphate-paraquat system)
- 2) tris-EDTA- NaN_3 (TEA)+NRB (nucleotid releasing agent for bacteria = komerční detergent)
- 3) $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 4) $\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{EDTA} + \text{adenosin} + \text{DMSO} + \text{močovina}$

Analýza ATP - ATP-TOX systém

- 18-24 hodinová buněčná kultura (libovolná) se naředí na potřebnou hustotu a přidá se k jednotlivým koncentracím testovaného vzorku

<i>ATP-TOX systém</i>	
<i>Organismus</i>	<i>Libovolná kultura.</i>
<i>Princip</i>	<i>ATP-TOX systém využívá měření aktivity buněčné ATP jako indikátoru růstové inhibice. Základní test pro měření ATP je založen na měření světelné luminiscence, která následuje po reakci luciferinu s ATP za přítomnosti luciferázy a hořčnatých iontů. Tento systém může být využit pro měření jakékoliv bakterie nebo řasy, která rychle roste v laboratorních podmínkách (Dutka 1988). Zkumavky se inkubují na rotační třepačce po dobu 5 hodin a po té se měří celkové množství vyprodukované ATP pomocí luciferin-luciferázové aktivity (dodává se luciferin-luciferázový roztok do testované směsi) na luminometru. Vzorek může inhibovat schopnost přidané luciferázy měřit produkci ATP, proto je třeba ještě ověřit, zda tento jev nenastal..</i>
<i>Reakční směs (V)</i>	<i>1 ml. (200 ul roztoku enzymu + 800 ul vzorku)</i>
<i>Předkultivace</i>	<i>Závisí na typu kultivovaných buněk (18-24)</i>
<i>Trvání testu</i>	<i>Po proběhlé expozici se provede rozrušení stěn buněk (činidlem – TCA, trichloroctová kyselina, sono – ultrazvuk). Tím dojde k uvolnění ATP do roztoku, ze kterého se odebírá 800 ul vzorku do reakční směsi.</i>
<i>Teplota</i>	<i>Závislá na vybrané kultuře.</i>
<i>Třepání</i>	<i>Doporučené.</i>
<i>Pozitivní kontrola</i>	<i>Chemické látky musí být vybírány s ohledem na možnou inaktivaci enzymu (viz princip).</i>
<i>Aseptická práce</i>	<i>Ano</i>

Analýza ATP - adenylate energy charge

$$EC = (ATP + 1/2 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$$

- míra energie skladované v adeninové energetické zásobě buněk
- indikátor metabolického statutu buněk
- rozsah 0 - 1; rostoucí buňka: 0,85; nerostoucí buňka: 0,5
- EC pod 0,4 je téměř irreverzibilní situace u vymírající populace; kolem 0,5 je klidový stav s neschopností biosyntéz
- existuje hodně studií AEC na *in vitro* kulturách a méně studií *in situ*
- Brookes (1983): AEC pro čerstvou půdu TTP 0,85, po vysušení pokles na 0,45 a po opětovném ovlhčení stouplo na 0,76
- těžké kovy snižují obsah ATP, ADP a AMP na polovinu, ale AEC zůstává stejné s kontrolní lokalitou ==> AEC není ideální indikátor stresu pod vlivem např. kovů, spíše indikátor stresu jako vysychání apod.

Analýza ATP - adenylate energy charge - metodika

- ultrazvuk rozruší buňky a následuje extrakce
- měření ATP použitím luciferázového systému, poté AMP a ADP konvertovány na ATP a opět měření luciferin-luciferázovým systémem (alternativou je měření na HPLC)
- výsledek závisí na použitém extrakčním činidle TCA, NaHCO_3 , H_2SO_4 ...

6) Anaerobní aktivity v půdě

- náročné způsoby manipulace se vzorky
- používané roztoky musí být bez kyslíku

Lze pak měřit zejména:

- anaerobní amonifikaci
- denitrifikaci (až na N₂)
- redukci železitanových iontů
- desulfurikaci
- atd.

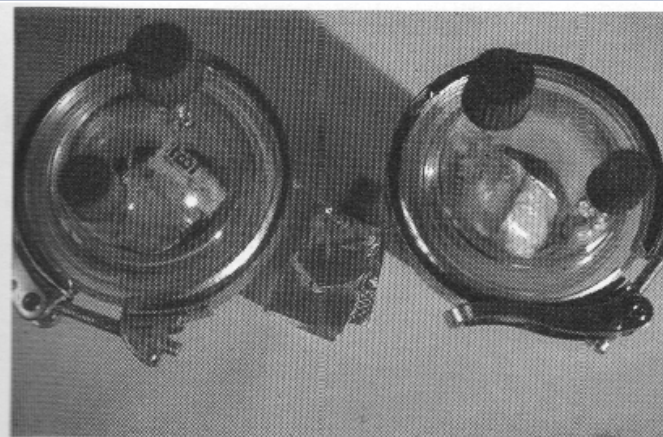


Figure 6.1. Jars for storing soil under anaerobic conditions.



Anaerobic sack.

Table 6.1. Anaerobic microbial processes in soil (Tiedje et al 1984).

Process	Reaction
Fe ³⁺ , Mn ⁴⁺ reduction	OM + Fe ³⁺ , Mn ⁴⁺ → Fe ³⁺ , Mn ²⁺
Denitrification	OM + NO ₃ ⁻ → N ₂ O, N ₂
Fermentation	OM → organic acids, principally acetate and butyrate
Nitrate respiration	OM + NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻
Dissimilatory NO ₃ ammonification	OM + NO ₃ ⁻ → NH ₄ ⁺
Sulphate reduction	OM or H ₂ + SO ₄ ²⁻ → S ²⁻
Carbon dioxide reduction	H ₂ + CO ₂ → CH ₄ , acetate
Acetate splitting	Acetate → CO ₂ + CH ₄
Proton reduction	Fatty acids and alcohols + H ⁺ → H ₂ + acetate + CO ₂

OM = organic matter.

7) Další významné metody sledování mikrobiálních aktivit

Mikrokalorimetrie:

- reprezentuje celkovou metabolickou aktivitu
- detekce změn až 10^{-6} °C v μ W

DMSO redukce

- DMSO je intermediát v globálním S cyklu a vzniká v atmosféře
- DMS je výsledkem metabolismu řas a bakterií
- půda se inkubuje s DMSO roztokem a po 3h se stanoví DMS plynovou chromatografií

Redukce Fe^{III} --> Fe^{II}

- v přítomnosti lehce dostupného organického materiálu (kvasničný extrakt)
- 20g půdy + 20 ml vody (může být přidána i toxická látka v různých koncentracích), Fe^{II} je stanoveno AAS
- test nelze užít jako stanovení *in situ*

Příklad:

Inkorporace methyl³H]thymidinu jako indikátor mikrobiální aktivity využita pro stanovení "bacterial community tolerance" v půdě kontaminované kadmíem

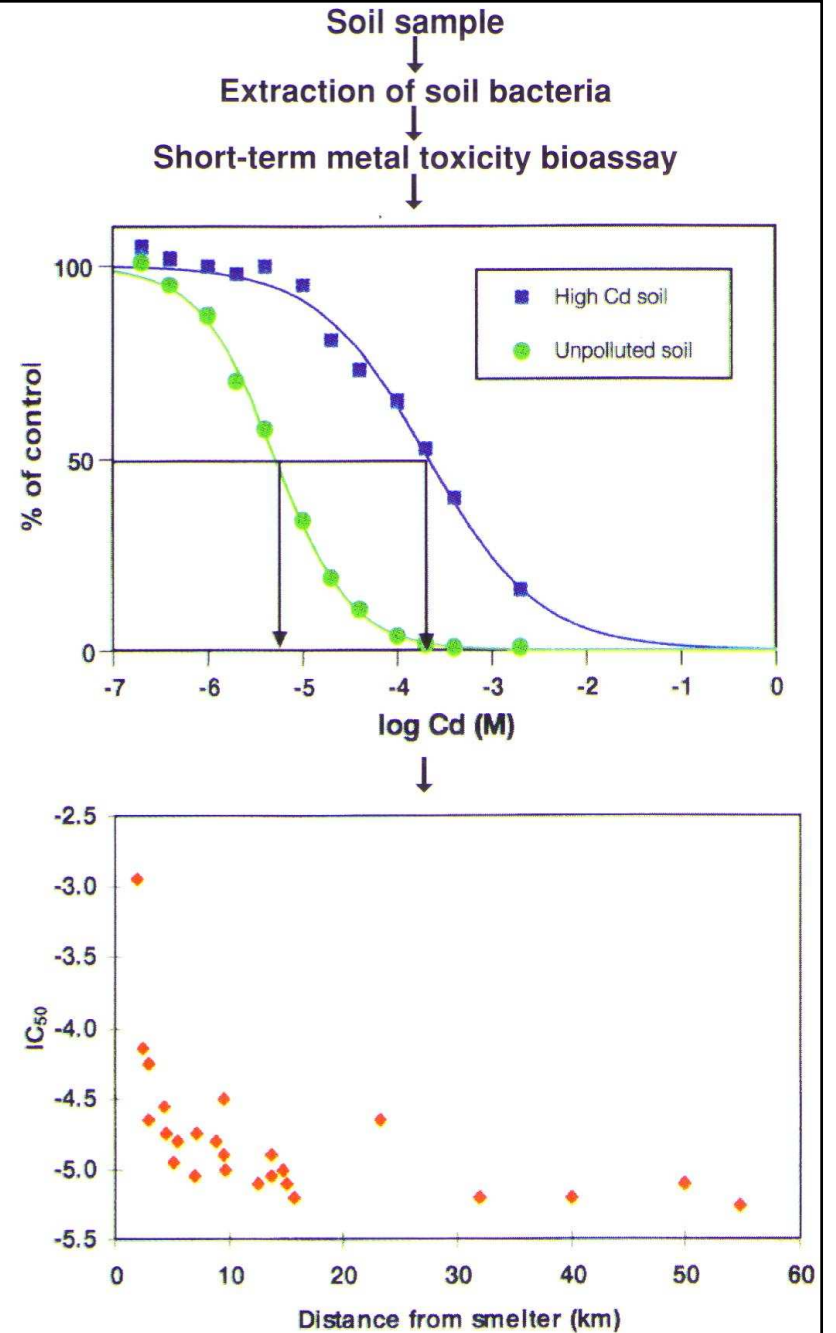


Figure 2. Flow chart of the analysis of bacterial community tolerance using the thymidine incorporation method. Two inhibition curves from the short-term metal toxicity bioassay are shown, one for a bacterial community extracted from a nonpolluted soil, and one from a Cd-polluted soil. The last plot shows the Cu tolerance of the bacterial community at different distances from the Rönnskär smelter in Sweden (redrawn from (22)). High IC₅₀ values found in the vicinity of the smelter indicate very Cu tolerant bacterial communities.

Existují i bakteriální biosenzory pro monitoring znečištění

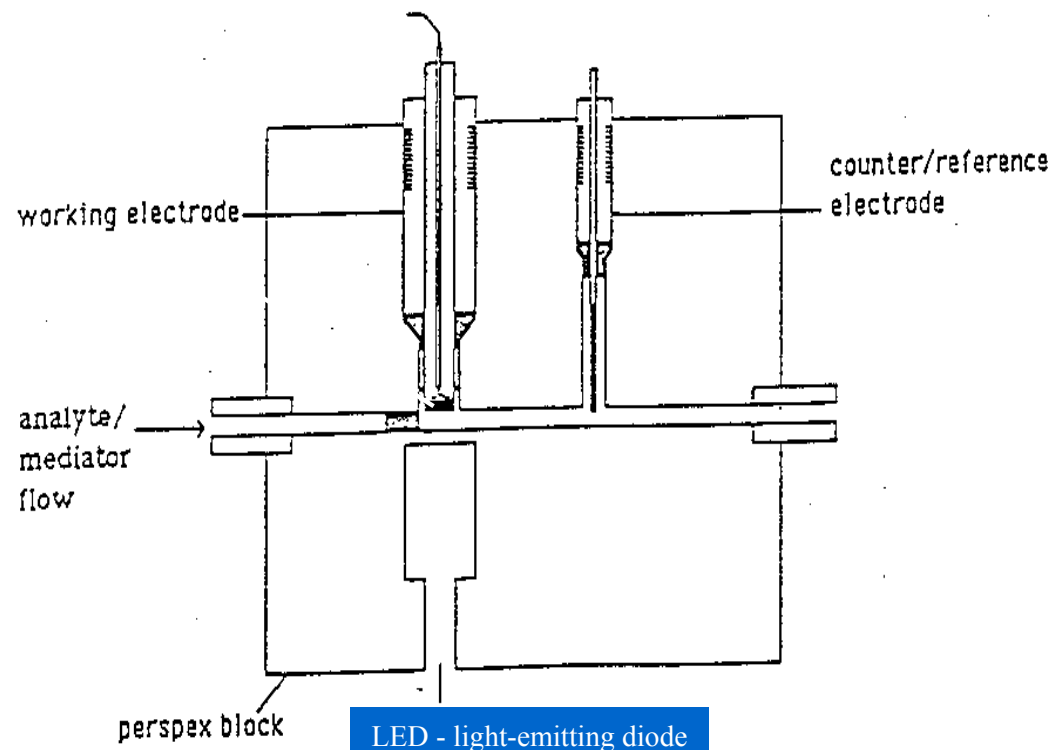
- biosensory inkorporují celé buňky a využívají zejména rod sinice *Synechococcus*, či bakterie *E.coli* a *Paracoccus denitrificans*

- umožňují citlivé kontinuální měření těžkých kovů, organometalů, fenolů i herbicidů

- aplikují se kapalně vzorky bez či s malou další přípravou ==> hlavně pro hodnocení vod, půdy a sedimenty vyžadují změnu fáze, z čehož vyplývá řada problémů (biodostupnost, hydrofobicita/hydrofilita ...)

- využívají skutečnosti, že biochemický signál lze převést do elektrického signálu: např. respirační či fotosyntetická aktivita souvisí s přenosem elektronů, které jsou darovány či odejmuty redoxními páry (tzv. mediátory), které jsou měřeny amperometricky či potenciometricky

- ◆ Incorporating enzymes (rapid response; sensitivity; even multienzyme systems). Measuring substrate consumption or product formation.
- ◆ Measurement of inhibition of enzymes of electron transport chain of microorganisms
- ◆ The whole cell biosensors - immobilized cells



Přístupy mikrobiální ekotoxikologie

- proces probíhá v pulzním režimu stimulace buněk a parametr je rozdíl mezi aktivním (stimulace světlem či přidání mediátoru) a odpočinkovým (není stimulace světlem či mediátorem) stavem buněk:

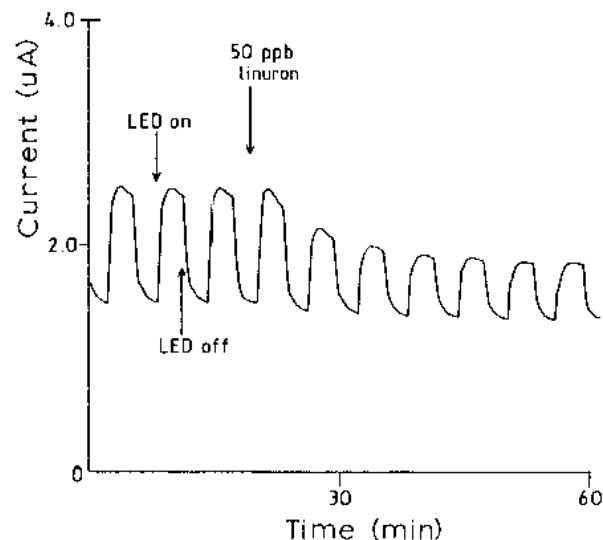


FIGURE 2. The mediated response of the synechococcal biosensor before and after exposure to 50 ppb linuron.

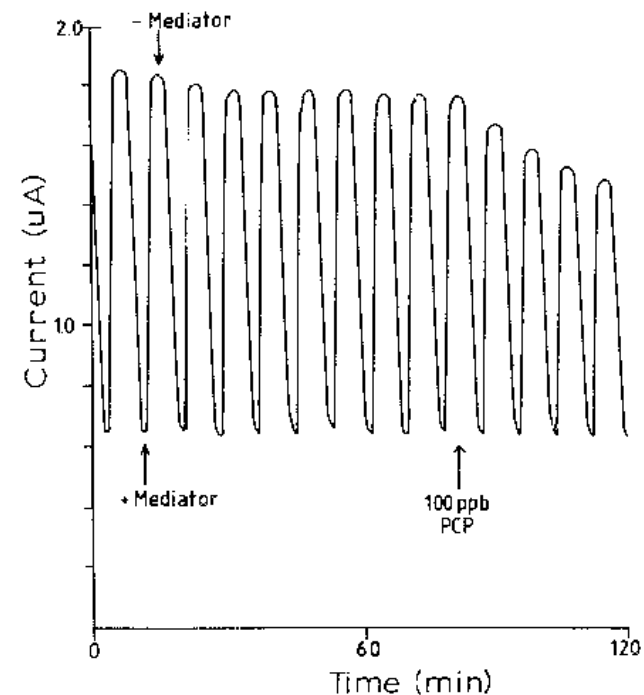
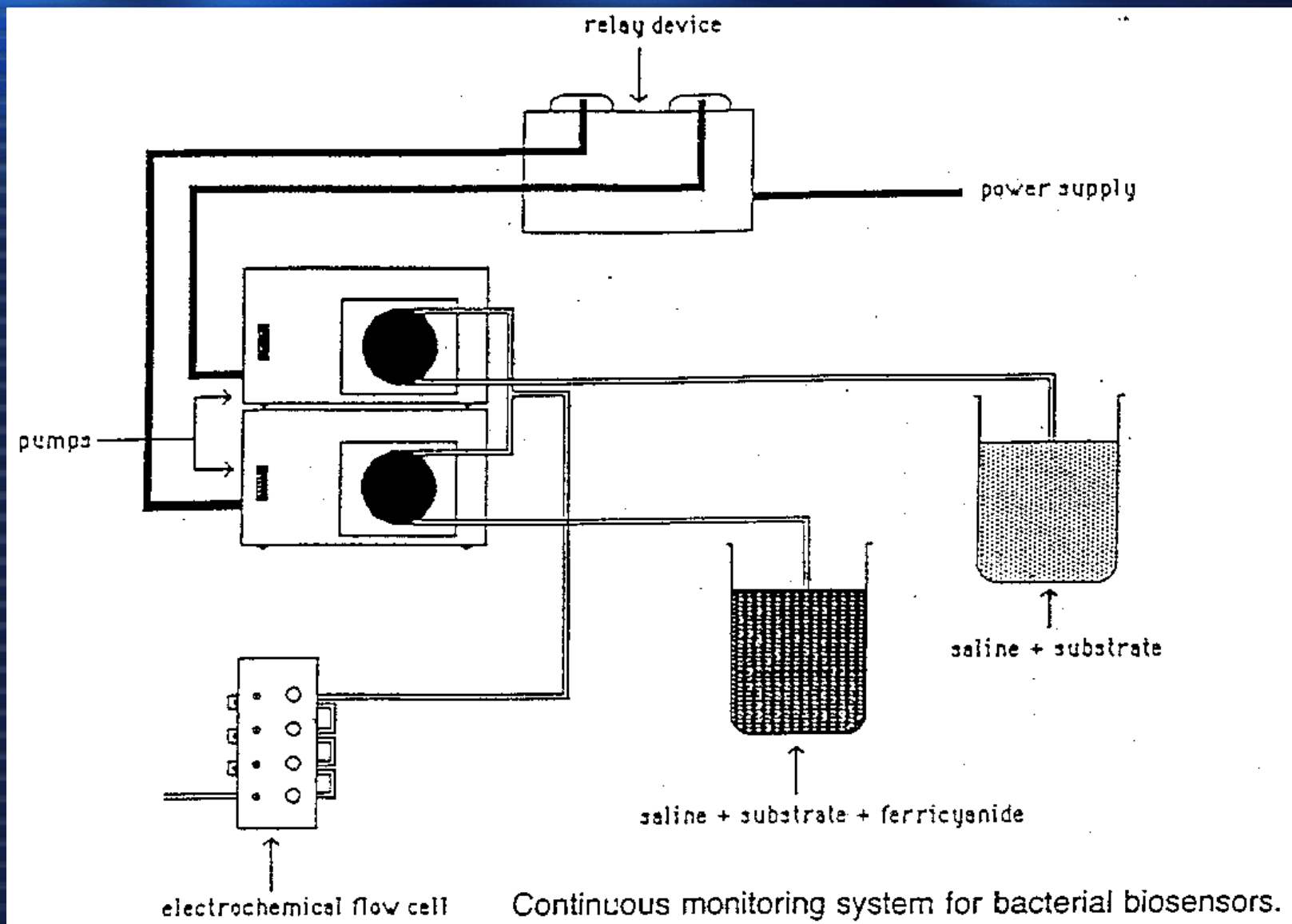


FIGURE 3. The mediated response of the *E. coli* biosensor before and after exposure to 100 ppb pentachlorophenol (PCP).

Biosenzory se ukázaly jako velmi citlivé zejména vůči organickým polutantům:

Sensitivity of a Range of Toxicity Tests to Pentachlorophenol

Toxicity test	Test time	EC ₅₀ (ppm)	Ref.
Rainbow trout lethality	96 h	0.115	25
Fathead minnow lethality	96 h	0.266	25
<i>Daphnia magna</i> motility	48 h	0.145	25
Microtox® bioluminescence	5 min	1.5	26
Activated sludge respiration	3 h	22.0	27
Resazurin reduction	30 min	8.0	28
<i>Escherichia coli</i> biosensor	30 min	0.400	
<i>Paracoccus denitrificans</i> biosensor	30 min	0.600	



Další vybrané komerční testy toxicity

Mutatox	
Organismus	<i>Využívání bakterie Vibrio fischeri - „dark mutant“ - za normálních podmínek nelumínuje (G-).</i>
Princip	<i>Jedná se o mutanta, u kterého je emise světla způsobena až reverzní mutací za přítomnosti mutagenních látek. (Ulitzur et al. 1980). Lyofilizované bakterie jsou rehydratovány a exponovány toxickou látkou. Po 16-24 hodinách se měří emise světla luminometrem. Test je prováděn s i bez enzymové aktivace S9. Použití +S9 je popsáno v práci Johnson 1992, aplikace bez -S9 v článku Kwan et al. 1990.</i>
Reakční směs (V)	<i>500 µl.</i>
Předkultivace	<i>30 minut v 37 °C vodní lázni.</i>
Trvání testu	<i>16 – 24 h.</i>
Citlivost	<i>Dodání S9 směsi má tendenci zvýšit detekční limit a snížit jednotnost výsledků, což může být vysvětleno nestandardními podmínkami pro metabolizaci (bakterie vyžaduje jen 15 °C, zatímco S9 směs byla vyvinuta pro Ames test při 37° C). S výsledky Mutatoxu také může interferovat cytotoxicita (stejný případ i u Ames testu). Zde se však může provést jako kontrola populačně růstový test založený na buněčné hustotě. (Willemsen et al. 1995). Byla potvrzena vysoká 93 % shoda s Ames testem (Legault et al. 1994). Mutatox byl schopen z 82% správně odlišit (ne)karcinogenní látky ve srovnání s Ames testem, který měl tuto schopnost nižší (73%).</i>
Teplota	<i>23 ± 1 °C.</i>
Třepání	<i>Ne.</i>
Pozitivní kontrola	<i>2-AA, 2-AF, BaP..</i>
Aseptická práce	<i>Ano.</i>
Doporučení	<i>Test je doporučen provádět v kombinaci s Microtox testem, který mu musí předcházet (Hauser et al. 1997).</i>

Další vybrané komerční testy toxicity

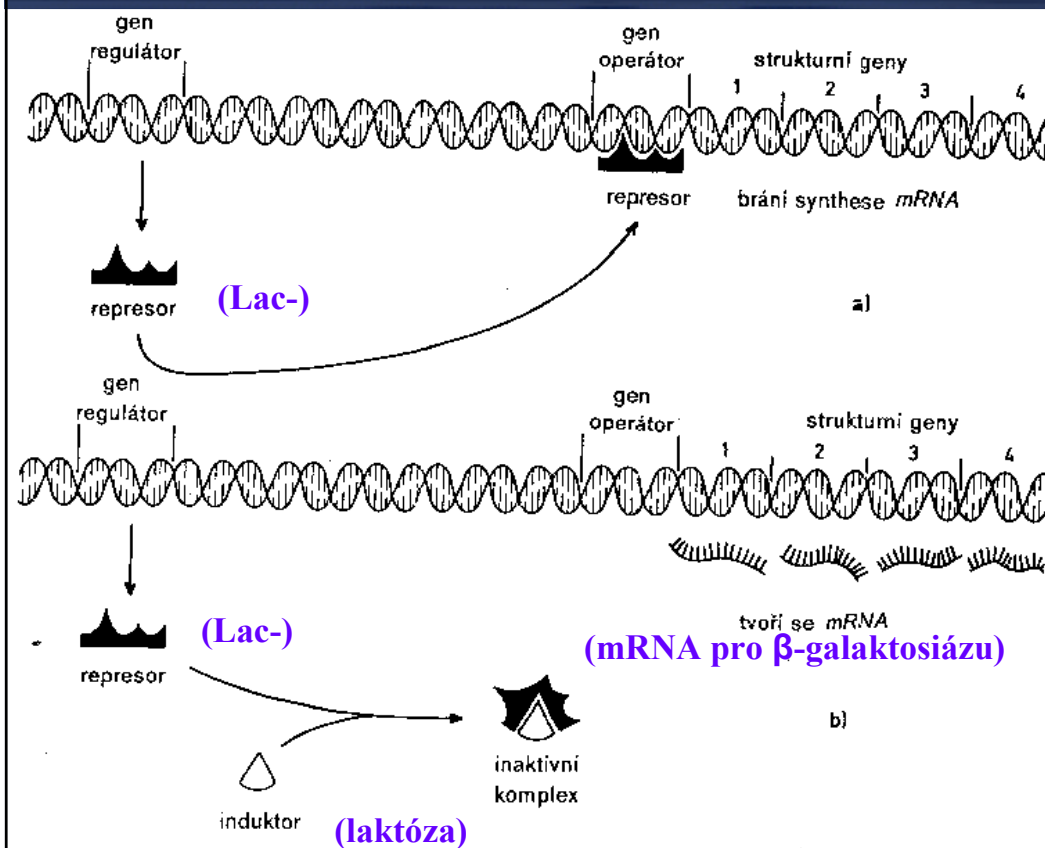
Toxi-Chromotest, Toxi-ChromoPad	
Organismus	<i>Escherichia coli</i> , gramnegativní (G-), K12 OR85.
Princip	Princip obou testů je založen na schopnosti toxikantů inhibovat de novo syntézu β -galaktozidázy v kmeni <i>Escherichia coli</i> , mutantu citlivému především k pesticidům, mykotoxinům a těžkým kovům (Kilroy et Gray 1995). Toxi-Chromotest je mikrodestičkový test, který slouží k testování kapalných vzorků a roztoků chemických látek. Při ToxiChromoPad variantě test probíhá ve zkumavkách. Vzorky se pak aplikují na filtrační papíry se substrátovou impregnací (test pro sedimenty, půdy). Lyofilizované bakterie jsou oživeny směsí živného média a specifického induktoru pro fenotypovou produkci enzymu. Jsou následně smíchány s testovaným vzorkem, který může inhibovat obnovovací proces a syntézu β -galaktozidázy. Směs je u Toxi-Chromotestu nanášena do serologických destiček a množství enzymu je stanoveno semikvantitativně kolorimetrickou reakcí nebo může být kvantifikováno na čtecím zařízení pro destičky (Reinhartz et al. 1987). V případě ToxiChromoPadu jsou výsledky hodnoceny jen srovnáním vytvořené kontrolní barvy na filtračním papíře s variantou vzorku (EBPI, 1995), (Kwan 1993, Kwan 1995, Rao et al., 1991).
Citlivost	Kwan et Dutka 1990 srovnávali tyto testy s Microtox [®] testem. Především u vzorků sedimentů jsou tyto testy méně citlivé, než Microtox. Naopak u mykotoxinů a pesticidů byl ToxiChromotest citlivější (Kilroy et Gray 1995).
Reakční směs (V)	U Toxi-ChromoPadu je reakční směs 500 μ l, u klasické mikrodestičkové verze Toxi-chromotestu 250 μ l.
Předkultivace	Dostatečná doba resuscitace 10 minut.
Aseptická práce	Aseptická práce je nutná při jakékoliv manipulaci se zásobní kulturou.
Trvání testu	2 hodiny.
Teplota	37 °C

TROCHU NA PŘIPOMENUTÍ:

Syntézy enzymů (bílkovin)

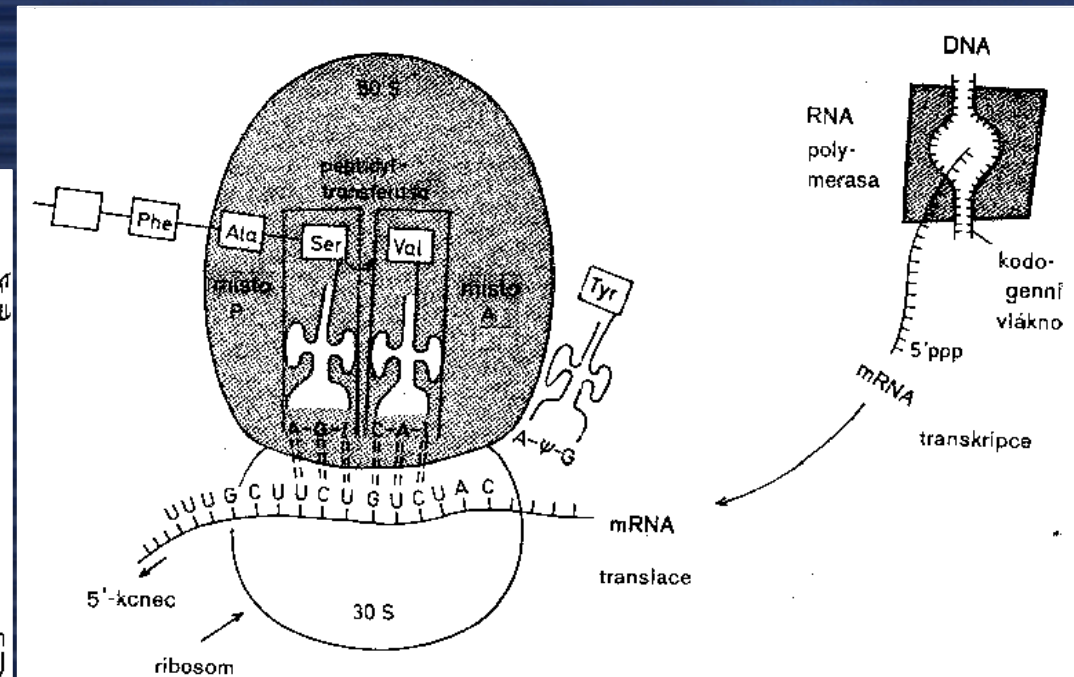
- 1) regulace genové aktivity
- 2) transkripce - přepis z DNA do mRNA
- 3) translace - překlad z mRNA do bílkoviny v ribozómech (rRNA) pomocí tRNA

Příklad pro E.coli (Lac-)



Obr. 7-6. Schéma regulace genové aktivity podle JACOBA a MONODA.

- a) Molekula represoru blokuje transkripci,
- b) represor byl inaktivován induktorem, takže transkripce probíhá nerušeně.



Obr. 7-5. Schéma biosynthesy bílkovin.

Vpravo nahoře je znázorněna transkripce: působením RNA-polymerasy se na matrici DNA tvoří mRNA, která je komplementární ke kodogennímu vláknu DNA. Vlevo je znázorněn průběh translace na ribosomu. Na vazebném místě pro peptidyl-tRNA (místo P) je vázána tRNA specifická pro serin, která nese vytvářející se peptidový řetěz; na místě A (vazebné místo pro aminoacyl-tRNA čili akceptorní místo) je vázána tRNA specifická pro valin, nesoucí valin. Vpravo je znázorněna tRNA^{Tyr} nesoucí tyrosin, která ještě není vázána, ale která se připojí na následující kodon, jakmile se mRNA posune o jednu kodonovou jednotku doleva (str. 159).

Další vybrané komerční testy toxicity

MetPlate	
Organismus	<i>Escherichia coli (G-).</i>
	<i>Princip těchto testů je obdobný jako u Toxi-Chromotestu. Bakteriální odpověď na toxický vzorek je měřená indukovaná syntéza enzymu β – galaktozidázy mutantního kmene E. coli (Bitton et al. 1992, Kong et al. 1995). Intenzita syntézy enzymu je závislá na metabolismu buněk.</i>
Reakční směs (V)	<i>1 ml (100 μl inokula + 900 μl vzorku)</i>
Trvání testu	<i>1 hodinu.</i>
Teplota	<i>35 °C.</i>

Testy genotoxicity na mikroorganismech

PROVEDENÍ

Klasické

Alternativní

Princip

Specifická mutace spojená s obnovením určité vlastnosti

Nespecifické poškození DNA spojené s indukcí SOS systému či jiného indikátoru

Design

Agarové plotny

Zkumavky, mikrodestičky

Délka

72 – 120 h

4 – 24 h

Výstup

Využití získané vlastnosti pro přežití a růst v nepříznivém prostředí

Indukce reportérového genu a jeho přepis

Hodnocení

Počty vzniklých kolonií buněk (CFU)

Spektrofoto-, lumino- či fluorimetrické hodnocení

Toxicita

Nežádoucí vliv

Zohledněna při vyhodnocování

Testy genotoxicity na mikroorganismech

- Amesův test
- Arabinózový test
- Ampicilínový test
- Reverzní test na *E. coli*
- Mutatox
- GFP test
- Reparační test
- UmuC test
- SOS chromotest
- Sul-A test
- Vitotox