

Ing. Petra Kučerová: Studium metabolismu vybraných xenobiotik pomocí rostlinných buněk

Školitel: **Dr. Ing. Martina Macková**

Studijní program: **Chemie**

Studijní obor: **Biochemie**

Datum obhajoby: **29.3.2001**

SOUHRN

Byla studována schopnost přeměny a metabolismus polychlorovaných bifenyly (PCB) v rostlinných buňkách pěstovaných *in vitro*. Přeměna PCB byla sledována měřením úbytku kongenerů PCB s různým stupněm chlorace obsažených v komerční směsi označené Delor 103 a individuálních kongenerů mono- a dichlorbifenyly. Úbytek PCB po biodegradaci byl analysován na plynovém chromatografu s EC detektorem. Schopnost přeměňovat PCB byla testována u 21 *in vitro* kultur různých rostlinných druhů a u vybraných druhů byl sledován vliv morfologické diference. Vyšší schopnost metabolisovat PCB byla naměřena u diferencovaných a/nebo u kultur transformovaných plasmidem půdní bakterie *Agrobacterium*. Tyto kultury též lépe reagovaly na toxické působení PCB, což se projevilo vyšším nárůstem buněk. Jako modelové systémy pro sledování přeměny monochlorbifenyly *in vitro* byly vybrány čtyři rostlinné druhy *Solanum nigrum* SNC 90 (lilek, kořenová kultura typu hairy root), *Medicago sativa* Alf (vojtěška, amorfní kalus), *Nicotiana tabacum* WSC 38 (tabák, amorfní kalus) a *Armoracia rusticana* K54 (křen, embryogenní klon s výhonky). Nejvyšší konverze monochlorbifenyly (2-, 3- a 4-chlorbifenyly) byla prokázána u kultury tabáku. Přeměna dichlorbifenyly (PCB 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 a 15) byla sledována u kořenové kultury typu hairy root *Solanum nigrum*. Kongener PCB 4 (2,2'-dichlorbifenyly) byl za daných podmínek metabolisován na zůstatek 84%, PCB 10 (2,6-dichlorbifenyly) a kongener PCB 6 (2,3'-dichlorbifenyly), byly metabolisovány na zůstatkové množství 87%, respektive 89%. Kongenery PCB 13, PCB 14 a PCB 15 nebyly metabolisovány vůbec. Další pokusy byly zaměřeny na sledování schopnosti vybraných rostlin odstraňovat PCB z reálné kontaminované půdy (experimenty ve kbelících i na pokusném poličku), současně byl sledován vliv kultivace rostlin na přítomnost a růst mikroorganismů žijících v rhizosféře a na povrchu kořenů. V půdě osázené lilkem a tabákem byl po pěti měsících stanoven poměrně významný pokles PCB v půdě, obě rostliny se osvědčily i v pokusech s kontaminovanou půdou v kultivačních nádobách (lilek 78%, tabák - zůstatek 76%). Z výsledků je zřejmý pozitivní vliv přítomnosti rostlin na růst indigenní, rhizosféry mikrofloru včetně mikroorganismů schopných využívat bifenyly, induktor bakteriální degradační dráhy PCB, jako jediný zdroj C a energie. V nevegetované půdě se vyskytovalo jen minimální množství těchto bakterií, u nichž je předpoklad, že mohou být také schopny odbourávat PCB. Celkové počty bakterií, izolované z rhizosféry oblastí testovaných rostlin byly srovnatelné, pouze u tabáku byl izolován počet vyšší, stejně jako v případě bakterií rodu *Pseudomonas* a mikroorganismů rostoucích na bifenyly. Pro sledování metabolismu monochlorbifenyly (PCB 1, 2 3) byly vybrány čtyři kultury různých rostlinných druhů pěstované *in vitro* (*Armoracia rusticana*, *Medicago sativa*, *Solanum nigrum* a *Nicotiana tabacum*). Analýza hlavních produktů byla zaměřena na hydroxychlorbifenyly. Část z nich se po srovnání hmotnostních spekter standardů podařilo identifikovat. 5-hydroxy-2-chlorbifenyly vznikající po kultivaci *Armoracia*

rusticana a *Solanum nigrum* s PCB 1, 4-hydroxy-3-chlorbifenyl a 6-hydroxy-3-chlorbifenyl po kultivaci obou rostlinných druhů s PCB 2 a 4'-hydroxy-4-chlorbifenyl po kultivaci všech testovaných rostlinných kultur s PCB 3. U kultury *Medicago sativa* se nepodařilo identifikovat žádné hydroxychlorbifenyly s výjimkou 4'-hydroxy-4-chlorbifenyly. Analýza a srovnání toxicity monochlorbifenyly a hydroxychlorbifenyly jako prvních vznikajících produktů metabolismu PCB u rostlin ukázaly, že vznikající intermediáty - hydroxychlorbifenyly jsou toxicitější, pravděpodobně díky vyšší rozpustnosti, než původní sloučeniny. Z tohoto důvodu následuje v rostlinných buňkách další krok přeměny hydroxychlorbifenyly např. na konjugáty s cukry nebo zabudování do buněčné stěny. Z výsledků je zřejmé, že působením rostlin dochází ke snížení obsahu PCB v kontaminované půdě, částečně vlivem degradujících mikroorganismů jejichž růst rostlina podporuje a částečně příjmem PCB do rostliny s následnými metabolickými přeměnami.

Klíčová slova: polychlorované bifenyly, rostlinné kultury *in vitro*, fytořemediace, rhizořemediace, rhizosféra, metabolismus, hydroxychlorbifenyly, toxicita

Ing. Petra Kučerová: Studying of the metabolism of xenobiotics by plant cells

Supervisor: **Dr. Ing. Martina Macková**

Study programme: **Chemistry**

Study subprogramme: **Biochemistry**

Date of defence: **29.3.2001**

SUMMARY

The metabolism of polychlorinated biphenyls (PCB) and the ability to transform these compounds by plant cells cultivated *in vitro* was studied. Level of transformation has been followed by estimations of the decrease of content of PCB congeners, with different degree of chlorination, contained in commercial mixture Delor 103 and by estimation of the decrease of particular congeners of mono- and dichlorobiphenyls. The decrease of PCB congeners after biotransformation was detected by gas chromatography with EC detector. Twenty-one cultures of different plant species and different morphological differentiation were examined for the ability to transform polychlorinated biphenyls. Differentiated plant cultures and/or plant cultures transformed by wild-type plasmid from *Agrobacterium* have shown higher capability to metabolise PCB congeners. These cultures also better tolerated toxic effect of PCB, which resulted in higher cell growth. Plant cultures *Solanum nigrum* SNC 90 (black nightshade, hairy root type), *Medicago sativa* Alf (alfalfa, amorphous calus), *Nicotiana tabacum* WSC 38 (tobacco, amorphous calus) and *Armoracia rusticana* K54 (a shoot-forming horse-radish culture) have been chosen as model systems to monitor biotransformation of monochlorobiphenyl congeners. Tobacco has shown the highest degree of monochlorobiphenyls (2-, 3- and 4-chlorobiphenyl) conversion. In the case of hairy root clone SNC 90 of *Solanum nigrum* the biotransformation of dichlorobiphenyl congeners (PCB 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 and 15) have been followed. 84 % of PCB congener 4 (2,2'-dichlorobiphenyl) has been found after biotransformation, congeners PCB 10 (2,6-

dichlorobiphenyl) and PCB 6 (2,3'-dichlorobiphenyl) have been metabolised to the residual amount of 87 % and 89 %, respectively. No kind of metabolic attack has been found in the case of the congeners PCB 13, PCB 14 and PCB 15. Next experiments have been focused on monitoring of the abilities of selected plants to remove PCB from contaminated soil (experiments carried out in pots and at a field, respectively). The influence of the cultivation of plants on the presence of soil microorganisms, which reside in rhizosphere and at the rhizoplane surface of plant roots, has been observed. Statistically significant decrease of PCB in the soil has been determined in the case of soil, which has been vegetated with nightshade and tobacco. Both plant species have shown good results also in experiments with contaminated soil in cultivation pots (nightshade residual PCB content 78 %, tobacco 76 %). Based on these results it is possible to predict positive influence of plants on the growth of indigenous, rhizospheric microflora and microorganisms capable to use biphenyl as a sole source of carbon and energy. Only minimal amount of said bacterial species, which have assumed ability to degrade PCB, was present in the bulk soil. Total amounts of microorganisms in the rhizosphere and rhizoplane were comparable for particular kind of plants; only for tobacco the observed total amount was higher. The same trend was detected in the case of bacterial genus *Pseudomonas* and microorganisms using biphenyl as a sole source of carbon and energy. Four cultures of different plant species (*Armoracia rusticana*, *Medicago sativa*, *Solanum nigrum* and *Nicotiana tabacum*) cultivated *in vitro* have been chosen for monitoring of monochlorobiphenyls metabolism (PCB 1, 2, 3). Hydroxychlorobiphenyls have been generated as essential products of the metabolism of said monochlorobiphenyls. Several of their products were identified by comparison with mass spectra of the standards. Above all it was 5-hydroxy-2-chlorobiphenyl, which is formed after the cultivation of *Armoracia rusticana* and *Solanum nigrum* with PCB 1, 4-hydroxy-3-chlorobiphenyl and 6-hydroxy-3-chlorobiphenyl, both identified after the cultivation of *Armoracia rusticana* and *Solanum nigrum* with PCB 2, and 4'-hydroxy-4-chlorobiphenyl, formed after the cultivation of all plant cultures with PCB 3. In the case of plant culture *Medicago sativa* no other hydroxychlorobiphenyls have been identified, except 4'-hydroxy-4-chlorobiphenyl. Analysis and comparison of toxicity of monochlorobiphenyls and hydroxychlorobiphenyls as initial products of PCB metabolism in plants have shown, that intermediates - hydroxychloroderivatives are more toxic, probably due to higher solubility than original chlorinated compounds. Because of this reason, the next step in hydroxychloroderivatives transformation is e.g. formation of conjugates with saccharides in plant cells. Presented work proved significant influence of plants on the processes, which can result in removal of xenobiotics from the environment. The results demonstrate significant importance of plants not only in the transformation of xenobiotics, but also in support of the other organisms, which can participate on degradation processes.

Key words: polychlorinated biphenyl, *in vitro* plant culture, phytoremediation, rhizoremediation, rhizosphere, metabolism, hydroxychlorobiphenyls and toxicity