

Izolace, charakterizace a identifikace mikroorganismů s bioremediačními schopnostmi

*Ing. Juraj Grígel, Mgr. Iveta Fikarová, Ing. Petr Beneš Ph.D., Mgr. Karel Waska Ph.D.,
Ing. Vanda Jagošová, Ing. Miroslav Minařík*

EPS, s. r. o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice

eps@epssro.cz

Souhrn

Pro detekci biodegradačních mikroorganismů se používají metody založené na principu enzymové aktivity nebo stanovení celkového počtu mikroorganismů. Protože v prostředí se nachází velmi specifické skupiny mikroorganismů (pomalu rostoucí, žijící pouze ve specifickém spojení s ostatními mikroorganismy, tzv. živé, ale nekultivovatelné bakterie), diverzita komplexních mikrobiálních společenství bývá za použití standardních kultivačních metod nevyhnutelně podhodnocena. Proto se při rozbořech stále více prací zaměřuje na metody izolace, charakterizace a identifikace skupin mikroorganismů bez kultivace, mezi něž patří také metody na bázi fluorescenční mikroskopie. Spojením těchto metod se stávajícími je možné lépe vyhledávat kmeny s biodegradačními schopnostmi a doplňovat tak firemní sbírku o mikroorganismy s vysokým biodegradačním potenciálem.

Úvod

Environmentální biotechnologie se opírá o potřebu poznat biologického činitele, být schopen ho opatřit (izolace v prostředí vs. sbírkový kmen) a sestavit strategii aplikace tak, aby byly splněny hlavní cíle: snížení koncentrace polutantu v ošetřovaném prostředí, za minimalizace nákladů a dodržení legislativního rámce.

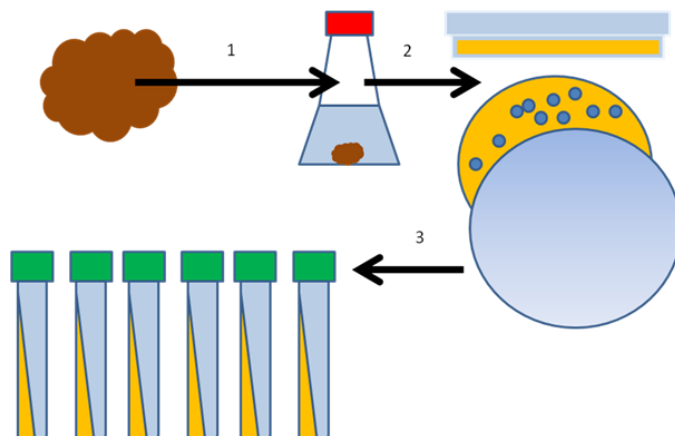
K izolaci a identifikaci žádaných mikroorganismů z prostředí byla vyvinuta řada fenotypových i genotypových metod. Identifikace mikroorganismů pomocí fenotypových metod je založena na využití vlastností mikroorganismů, které jsou určeny spolupůsobením genotypu a prostředí. Pro izolaci, rodovou a druhovou identifikaci jsou popsány především metody kultivační, biochemické a fyziologické (např. stanovení metabolické aktivity či intenzity chemických transformací). Metody imunologické, chemotaxonomické, biotypizační, fagotypizační aj. lze aplikovat k typizaci izolátů. Jejich použití v mikrobiologii vody je omezené. Genotypové metody (molekulárně biologické), které využívají genetickou informaci uloženou v buňce, se používají stále častěji. Těmito technikami lze detekovat mikrobiální rody, druhy i kmeny.

Izolace mikroorganismů s bioremediačními schopnostmi

Chemoorganotrofní mikroorganismy vyžadují pro svůj růst zdroj uhlíku ve formě organických sloučenin. Většina mikroorganismů disponuje schopností využít jednoduché substráty (sacharidy, bílkoviny, aminokyseliny apod.), naopak jen některé skupiny mají k dispozici enzymový aparát pro utilizaci méně běžných látek (vosky, uhlovodíky, složitější polysacharidy, syntetické látky apod.).

Vhodným materiálem pro izolaci mikroorganismů s degradačními schopnostmi jsou půdy, sedimenty či kaly s dlouhodobou přítomností kontaminantů (místa dlouhodobě kontaminovaná nebo opakovaně zatěžovaná, aktivovaná kaly z průmyslových a některých městských ČOV).

Obvykle se postupuje tak, že se vzorek kontaminované matrice přenese do tekutého média a pomnoží se. Jediným C-zdrojem je přitom stejný kontaminant, jaký se nacházel i v kontaminované matrici. Poté následuje vynesení mikroorganismů na ztužené půdy. Uvedený postup ilustruje obr. 1. Protože při bakteriálním rozkladu látek (např. uhlovodíků nebo některých polymerů) většinou klesá pH prostředí, bývá někdy účelné při vlastní izolaci na pevných médiích doplnit složení média o indikátor pH a tak zvýraznit kolonie, schopné rozkladu. Na obr. 2 je vidět kmen izolovaný z matrice kontaminované MTBE. Druhou možností je rozředění vzorku ve fyziologickém roztoku (nebo pyrofosforečnanovém roztoku) a aplikace rovnou na ztužená média obsahující kontaminant. Aplikace kontaminantů do růstových médií musí respektovat jejich vlastnosti (termostabilita, rozpustnost, těkavost). Nerozpustné látky mohou být aplikovány v jemných krystalcích nebo v suspenzi, těkavé sloučeniny v parách.



Obr. 1: Schéma izolace mikroorganismu ze vzorku. 1) převedení vzorku půdy vhodného kultivačního média, ředění vzorku, 2) vynesení vhodného ředění na agar, 3) uchovávání izolovaných mikroorganismů

Charakterizace mikroorganismů s bioremediačními schopnostmi

U izolovaných kmenů se ověří rozsah biodegradační aktivity v prostředí s různou koncentrací kontaminantu (např. v multikultivačním zařízení Bioscreen) a pokud je jejich biodegradační potenciál shledán dostatečný, jsou takovéto kmeny uloženy ve sbírce mikroorganismů naší společnosti. Tato sbírka slouží jako základ pro vývoj bioaugmentačních preparátů na lokality kontaminované ropnými a chlorovanými uhlovodíky, ftaláty, fenoly apod. (*in situ* realizace, *ex situ* aplikace).

Růst bakteriální kultury můžeme rozčlenit do několika růstových fází. Přípravná fáze (lag fáze) je doba, kdy se buňky nedělí a probíhá pouze adaptace na nové prostředí. Délka lag fáze je dána množstvím a velikostí změn, které se buňky musí přizpůsobit. Dále následuje fáze zrychleného růstu, kdy se buňky již začínají dělit postupně se zvyšující se rychlostí a se zkracující se generační dobou. Exponenciální fáze (logaritmická fáze) je charakterizována exponenciálním přírůstkem biomasy a nejkratší generační dobou. Ve stacionární fázi je přírůstek a úbytek buněk v rovnováze. V poslední fázi, tj. fázi umírání, počet buněk klesá a buňky se již přestávají rozmnožovat. Grafickým znázorněním těchto procesů je růstová křivka.



Obr. 2: Detail ztuženého média izolátu EPS 012, který byl izolován z matrice kontaminované MTBE

Identifikace mikroorganismů s biodegradačním potenciálem

Světelnou mikroskopií lze využít pro stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vzorku, barvením lze vizualizovat buněčné komponenty a u vitálně barvených preparátů se dají rozlišit živé/mrtvé buňky,

kontrola čistoty připravovaného biopreparátu apod. V oblasti bioremediačních technologií nabízí stále širší uplatnění fluorescenční mikroskopie, a to především díky velké rozmanitosti fluorescenčních sond, které jsou v současnosti dostupné na trhu. Příkladem mohou být sondy na bázi *live and dead staining*, která indikují viabilitu sledovaných mikroorganismů. Fungují však na odlišném principu při stanovení bakterií a kvasinek a umožňují stanovit podíl kvasinek a bakterií. Dalším uplatněním je např. studium vlivu expozice toxických látek (polutantů) nebo prostředí (kyslík x nedostatek kyslíku) na mikroorganismy. Za zmínku stojí i tzv. FISH metoda (fluorescenční *in situ* hybridizace). Principem FISH je hybridizace fluorescenčně značené DNA sondy se specifickým úsekem 16S nebo 23S rRNA. Zhybridizované sondy se poté kvantifikují pomocí fluorescenčního mikroskopu. Velký význam nacházejí při identifikaci určitých skupin mikroorganismů ve směsných konsorciích (v cytologických preparátech, biofilmech, sedimentech, kalech a vzorcích vod a zemin).

Systém BIOLOGTM umožňuje identifikovat mikrobiální druhy a také získat informaci o jejich funkční způsobilosti. V průběhu vývoje společnost Biolog Inc. postupně uvedla na trh různé verze destiček typu Biolog GN, GP, Biolog EcoPlatesTM a Biolog MT. Destičky typu GN a GP byly vyvinuty pro identifikaci gram pozitivních a gram negativních bakterií a mají na svém povrchu imobilizovaných 95 různých substrátů umožňujících přesnou identifikaci bakteriálních druhů na základě specifického kódu, který svým využíváním uhlíku vytvářejí. Naproti tomu destičky typu EcoPlatesTM obsahují 31 substrátů ve třech opakováních. Substráty jsou kombinací typů GP a GN + jsou doplněny o exudáty rostlin vyskytující se v půdě, čímž tento systém dokonale modeluje půdní prostředí. Na destičkách typu MT je imobilizováno pouze barvivo a substráty je možné si navolit dle potřeby a konkrétního záměru. Zpravidla jsou jimi různé organické látky, ale také polutanty.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Obr. 3: Mikrodestička systému BIOLOGTM

Konzervace mikroorganismů s biodegradačními schopnostmi

Lyofilizace neboli mrazová sublimace se nejčastěji používá k přípravě lyofilizátů mikrobiálních kmenů za účelem jejich dlouhodobého uchování. Lyofilizace se zatím jeví být nejšetrnějším způsobem pro zachování růstové aktivity mikroorganismů. Mikrobiální kmeny se namnoží ve vhodném médiu, odstředí se, rozmíchají v lyoprotekčním médiu a lyofilizují se. Princip metody je v odnímání vody ze suspenze zmražených buněk ve vhodném médiu, dochází tedy k zakonzentrování vzorku s využitím mrazového sušení.

Závěr

Společnost EPS, s.r.o. intenzivně hledá nové možnosti v oblasti bioaugmentace a biostimulace, které mají hlavního společného jmenovatele v podobě účinného, adaptabilního a odolného biologického činitele. I přes preferovaný postup zakládající se na biostimulaci autochtonní mikroflóry, představuje bioaugmentační koncept stále velmi účinnou cestu nápravy škod na životním prostředí. Předpokladem k tomu je propracovaný proces umožňující studium mikroorganismů s bioremediačním potenciálem, charakterizace jejich vlastností a hledání nejvhodnějšího způsobu nakládání s nimi v rámci technických a technologických aplikací. Kvalitně vedená sbírka vhodných bioremediačních taxonů se tak ukazuje jako důležitý prostředek, na jehož základě lze rychle a účinně uspokojit požadavky vyplývající z řešení

environmentálních projektů, popř. hledání řešení pro méně frekventované typy znečištění se silným akcentem na biologické řešení problému.