

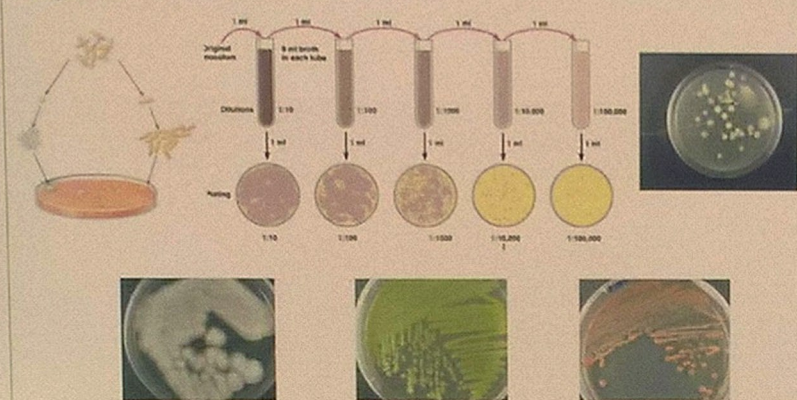
IZOLACE, CHARAKTERIZACE A IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ S BIOREMEDIAČNÍMI SCHOPNOSTMI

Juraj Grigel, Iveta Fikarová, Petr Beneš, Karel Waska, Vanda Jagošová, Miroslav Minařík

Pro detekci biodegradabilních 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 rozbořích stále více prací zaměřuje na metody izolace, charakterizace a identifikace skupin mikroorganismů bez kultivace, mezi něž patří metody na bázi fluorescenční mikroskopie. Spojením těchto metod se stávajícími je možné lépe vyhledávat kmeny s biodegradabilními schopnostmi a doplňovat tak firemní sbírku o mikroorganismy s vysokým biodegradabilním potenciálem.

Isolace mikroorganismů s biodegradačním potenciálem

Pro izolaci mikroorganismů s biodegradačním potenciálem, které se vyskytují převážně na dlouhodobě kontaminovaných lokalitách, se využívají různá selektivní média. Půdní vzorek určitého objemu se rozsuspenduje ve standardním objemu sterilního extrakčního roztoku a vzorek se dále ředí desítkovým ředěním. Extrakt z několika ředění se následně vysévá na specifický agar. Zde se po určitém čase sleduje nárůst kolonií mikroorganismů. Jednotlivé kolonie se poté izolují a pasážují. Izolovaný mikroorganismus podrobíme dalším experimentům na potvrzení biodegradačních schopností.

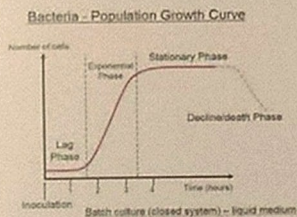


Charakterizace mikroorganismů s biodegradačním potenciálem

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.

Nejjednodušším způsobem sledování biomasy je měření změny optické hustoty na spektrofotometru. Použití spektrofotometrie umožňuje screening biodegradčního potenciálu jednotlivých izolátů a optimalizaci různých parametrů kultivace.

Zařízení Bioscreen C umožňuje sledovat až 200 růstových křivek a umožňuje tak výrazné zrychlení celého procesu charakterizace biodegradačních mikroorganismů.



Identifikace mikroorganismů s biodegradačním potenciálem

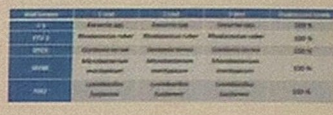
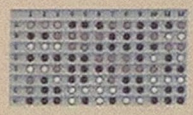
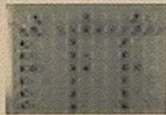
Světelná a fluorescenční mikroskopie

Využití světelné a fluorescenční mikroskopie v identifikaci biodegradčních mikroorganismů je poměrně významné. Pomocí mikroskopu můžeme pozorovat důležité morfologické znaky buněk, jako jsou tvar a velikost. Pozorujeme-li suspenzi živých nebarvených buněk hovoříme o nativním preparátu. Pro vybarvení buněk (jednoduché nebo diferenční barvení) můžeme využít celou řadu barviv. Ve fluorescenční mikroskopii nám metoda Live/Dead pro bakterie a kvasinky umožňuje velice sofistikované studovat reálný fyziologický stav sledované populace mikroorganismů.



Identifikace kultur systémem BIOLOG™

Identifikace je založena na schopnosti mikroorganismů metabolizovat uhlíkové substráty umístěné na 96-ti jamkové mikrotitrační destičce systému BIOLOGTM. Pokud naočkováné buňky mají enzymy schopné metabolizovat dané substráty, dochází k uvolnění elektronů ze substrátu (oxidace). Elektrony přijímá barvivo trifenyltetrazolium chlorid (TTC), dochází k redukci a ke vzniku trifenylformazanu (TPF) doprovázeného změnou barvy. Po inkubaci následuje vizuální vyhodnocení zabarvení a jeho přenesení do programu, který na základě konfigurace barev provede identifikaci.



Konzervace mikroorganismů s biodegradačním potenciálem

Lyofilizace neboli mrazová sublimace se nejčastěji používá k přípravě lyofilizátů mikrobiálních kmenů za účelem jejich dlouhodobého uchování. Lyofilizace se zatím jeví být nejšetnější způsobem pro zachování růstové aktivity mikroorganismů. Mikrobiální kmeny se namoží 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 zakoncentrování vzorku s využitím mrazového sušení. Pracovní teplota během lyofilizace je až -85°C. Lyofilizáty je vhodné uchovávat při teplotách okolo 4 °C, prodlužuje se tak jejich „trvanlivost“. Kromě uchovávání mikrobiálních kmenů může lyofilizace sloužit k zakoncentrování různých mikrobiálních produktů, např. extracelulárních proteinů.



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. V rámci interních vývojových aktivit společnost hledá způsoby, jak efektivně zapojovat vhodné taxony bakterií a kvasinek do konstrukce nových bioremediačních přístupů. 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 uspokojit rychle a účinně požadavky vyplývající z řešení environmentálních projektů, popř. hledání řešení pro méně frekventované typy znečištění se silným akcentem na biologické řešení problému.