

MOLEKULÁRNÍ TECHNIKY V BIOREMEDIACÍCH

Jiří Mikeš, Martina Siglová a Miroslav Minařík

EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice, e-mail: vyvoj@epssro.cz

Klíčová slova: nekultivovatelné mikroorganismy (VBNC), molekulárně-biologické metody

Abstrakt

Tento příspěvek řeší dvě klíčové oblasti, které se stěžejním způsobem dotýkají problematiky technické ochrany životního prostředí. Fenomén tzv. nekultivovatelných mikroorganismů je téma, které za současného intenzivního rozvoje dekontaminačních metod na biotechnologickém principu zasluhuje stále výraznější pozornost, neboť právě tyto mikroorganismy bývají často nositeli unikátních vlastností spojených se schopností transformovat polutant do podoby méně nebezpečné. Druhým tématem je skutečnost, že stávající konvenčně využívané metody kontroly a monitoringu mikrobiálních aktivit se začínají ukazovat jako nedostatečné a v mnoha ohledech nevystihující realitu poměrů v mikrobiálním snímku profilu přítomných autochtonních populací, ale i populací vnesených do prostředí v podobě aktivního bioremediačního zákroku. Společným jmenovatelem problémů obou směrů je informační deficit mezi širší odbornou veřejností vyvolaný obtížnější uchopitelností teoretického rámce, jenž vyžaduje určité znalosti molekulárně-biologických principů. Účelem příspěvku je poskytnout srozumitelnou formou základní informační výbavu a na několika konkrétních příkladech názorně demonstrovat možnosti, potenciál a praktické aplikování v kontextu efektivnější analýzy a monitoringu rozkladných procesů v kontaminovaném prostředí.

Úvod

Interdisciplinární pojetí sanačních technologií se ukazuje jako klíčový předpoklad pro konstrukci a design takových zákroků na kontaminované matici životního prostředí, které povedou k účinné eliminaci antropogenního polutantu a zároveň vyvolají minimum vedlejších škodlivých účinků na horninové prostředí a jeho biologické složky. Všechny čtyři základní koncepty bioremediace se opírají o metabolické a fyziologické dispozice mikrobiálních činitelů. Stávající frekventovaně využívané metodologické zázemí již nedokáže plně saturovat potřeby pro efektivní a racionální konstrukce sanačních zákroků koncipovaných jako bioremediace, popř. kombinovaná technologie. V kapitole *Nekultivovatelné mikroorganismy* je srozumitelnou formou vysvětleno, proč některé mikroorganismy nejsou schopné vytvořit kolonie na ztužených živných půdách a vyhýbají se tak možnosti být zahrnuty do kvantifikace a charakterizace snímku profilu mikrobiálních populací. Problém, jímž se zabývá předešlá kapitola, může být řešen. Klíčem k odstranění nedostatků se ukazuje být analytická molekulární biologie. Kapitola *Molekulárně-biologické metody* je stěžejním textem tohoto příspěvku. Vytkla si za cíl zpřístupnit tuto problematiku i odborníkům disponujícím jiným typem vzdělání a především je přesvědčit o smysluplnosti tohoto přístupu v sanační praxi. V podstatě se jedná o velice zjednodušenou učebnici základů molekulární biologie, uchopenou tak, aby poskytla nezbytné informační penzum, vyvolala zájem a umožnila orientovat se v problematice i těm, kdo nedisponují biologickým vzděláním. Následující kapitola *Implementace do sanačně-inženýrské praxe* již ukazuje způsoby, jak se orientovat ve výstupech specialistů a jak prakticky uchopit možnosti, které toto směřování biotechnologicky řešené technické ochrany životního prostředí nabízí.

Nekultivovatelné organismy

Je třeba respektovat, že není snadné objektivně kvantifikovat skutečný počet a druhové zastoupení všech, zejména mikrobiálních taxonů. Předpokládá se, že dosud je díky kultivačním metodám konvenčního charakteru popsáno pouze 3 100 mikrobiálních rodů, přičemž na základě různých důkazů, molekulárně-biologických testů a evolučně-biologických hypotéz se předpokládá, že celkový počet mikroorganismů, jejichž přirozeným habitatem je Země, osciluje v rozpětí 300 000 – 1 000 000 mikrobiálních rodů. V 1 gramu průměrného půdního vzorku bylo molekulárními technikami zjištěno přibližně kolem 10 000 různých mikrobiálních druhů [1], z čehož lze na základě předchozích uvedených skutečností konstatovat, že dostupné snímky profilů mikrobiálních společenstev zdaleka nekorelují se skutečným stavem. Drtivá většina mikroorganismů žijících v přirozeném prostředí je adaptována na nutričně velmi chudé a specifické podmínky. Skutečnost, že nejsou schopné růst v podmínkách umělých kultivačních systémů není důkazem, že v prostředí nejsou přítomné. Naopak, tyto organismy vykazují v reálných podmínkách vysokou metabolickou a fyziologickou aktivitu a nedílnou měrou iniciují klíčové biogeochemické procesy. V kontextu tohoto příspěvku by uvedená sdělení měla posloužit zejména k zamyšlení nad objektivitou konstatování, na kolik zavádějící může opření tvrzení spojených s výskytem mikroorganismů o tzv. ukazatel CFU¹ (kolonie tvořící jednotky) samo o sobě být. Odhad podílu na atenuačních procesech, biodegradační činnosti a schopnosti přispívat k biologické formě rozkladu kontaminantů je proto ještě více nejistý.

Molekulárně-biologické metody

Detekce, identifikace a kvantifikace mikroorganismů se provádí kultivačními metodami, mikroskopickými technikami, popř. biochemickými a imunochemickými testy. Uvedené přístupy doprovází mikrobiologii od jejího nejranějšího období. Nicméně se ukazuje, že objem a kvalita informací, jež lze tímto způsobem získat, se ukazuje jako nedostačující s ohledem na co nejvěrnější zachycení obrazu reálných poměrů v rámci mikrobiálních populací přítomných v různých typech prostředí, v průmyslových výrobních postavených na biotechnologickém principu (nebo takových, kde hrozí reálné nebezpečí mikrobiální kontaminace) a ve spojení s lidským zdravím. Hlavní problém představuje v předcházejícím odstavci charakterizovaná skupina nekultivovatelných mikroorganismů. Vývoj molekulární biologie ukázal, že uplatnitelnost těchto poznatků je výrazně širší a přesahující rámec této biologické disciplíny. Ve spojení s environmentální mikrobiologií představuje zásadní přínos možnost studovat mikrobiální populace nezávisle na jejich kultivaci, která vždy představuje zdroj zkreslení a změnu podmínek panujících v reálném prostředí při veškeré snaze tyto poměry zachovat. Typickým příkladem je populace mikroorganismů disponující schopností využívat jako svůj zdroj uhlíku a energie např. estery kyseliny ftalové v prostředí s nízkou koncentrací kyslíku. Konvenční kultivační metody využívající ztužené živné půdy řeší tuto situaci přípravou komplexního agarového média (obsahuje optimální zdroj nutrientů) a minerálního agarového média s nátěrem polutantu. Smyslem kultivace na prvně uvedeném typu média je získat představu o všech mikroorganismech přítomných ve vzorku, smyslem kultivace na druhém typu agaru je dále

¹ CFU, *colony-forming units* – ukazatel využívaný v klasické technické mikrobiologii ke kvantifikaci mikrobiálních společenstev; představuje úhrnný počet mikrobiálních entit, které za definovaných podmínek byly schopné narůst na ztuženém kultivačním médiu (tzv. agary)

úsilí postihnout mikroorganismy s bioremediačním potenciálem. Mikrobiální populace vyskytující se v přirozeném prostředí jsou často adaptované na nutričně velmi chudé podmínky, využívají řadu výhradně anorganických látek a nabídka komplexního zdroje živin, již představuje živná půda na bázi ztuženého koncentrátu proteinů, polysacharidů a dalších látek může vyvolat neschopnost v takových podmínkách růst v důsledku neschopnosti adaptovat rychle svůj metabolismus novým podmínkám. V případě minerálního média s nátěrem polutantu zase může nastávat inhibice v důsledku příliš vysoké koncentrace polutantu na povrchu agaru, která je neslučitelná s fyziologickými a metabolickými nároky konkrétní populace. Výše uvedený příklad ilustruje typický zdroj nepřesností v technické mikrobiologii. Řešením uvedených komplikací a nepřesností tudíž musí být taková metodologie, která principiálně nezávisí na kultivaci mikroorganismů. Právě tuto charakteristiku lze nalézt u metod založených na molekulárně-biologické bázi. Nejčastěji se zaměřuje na nositele genetické informace, tedy na nukleové kyseliny (DNA a RNA), v pokročilejších případech také na mastné kyseliny a proteiny se specifickými vlastnostmi. Vlastní práce se obecně sestává ze tří kroků, které následují v pořadí extrakce a izolace nukleových kyselin, jejich purifikace a vlastní molekulárně-biologická analýza. Proč izolovat právě nukleovou kyselinu? Tyto makromolekuly kódují veškeré informace o schopnostech organismu. DNA tedy v kontextu environmentální mikrobiologie poskytuje informace fylogenetického charakteru (zařazení organismu do systému) a informace, jež lze označit jako funkční (míra aktivity populace). RNA naopak poskytuje nástroj pro sledování neaktivnější populace. Nukleové kyseliny lze získat oddělením buněk od původní matrice (např. vzorek horninového prostředí) a následným rozbitím buněk (tzv. lyzí). Méně pracným postupem je celková lyze vzorku, nicméně v tomto případě vzorek vyžaduje pracnější purifikaci. Způsob, jakým se vlastní lyze provádí, může být chemický, enzymatický nebo fyzikální a jeho volba bývá ovlivněna charakterem vzorku a specifickými podmínkami následujících analytických kroků. Purifikace se v zásadě opírá o denaturaci proteinů, eliminaci polysacharidů a polyfenolů a v případě vzorků prostředí také o odstranění huminových látek. Všechny uvedené součásti buněčných struktur a prostředí by negativně interferovaly v dalším postupu.

Vlastní analýza se může opírat o zvolení vhodného typu tzv. genové próby. V podstatě se jedná o řetězec nukleotidů, který je komplementární ke konkrétní sekvenci nukleové kyseliny mikroorganismu. Nukleotidy jsou stavební jednotky nukleových kyselin. Jinými slovy lze genovou пробу charakterizovat jako značku, díky které lze následně mikroorganismus detekovat. Pro vyhledávání určitých mikrobiálních druhů se uplatňují druhově specifické próby, pro hledání konkrétních vlastností dané mikrobiální populace se nabízí tzv. funkční próby. Na základě použité próby se provede proces hybridizace.

Extrahované molekuly nukleových kyselin se zmnoží pomocí polymerasové řetězové reakce. Použitím tzv. restričních endonukleas (v podstatě enzymové nůžky) dojde ke štěpení nukleových kyselin v místech, která se vyznačují specifickými sekvencemi. Získané fragmenty se následně separují v agarosovém nebo polyakrylamidovém gelu. Pro vlastní vyhodnocení je nutné, aby se separované fragmenty lišily v sekvencích v restričních místech nebo v délce úseku nukleové kyseliny ohraničené běžnými místy pro štěpení restričními enzymy. Vlastní analytická koncovka se nejčastěji provádí metodami gradientových gelových elektroforéz. Separace úseků nukleové kyseliny v případě metody DGGE (denaturační gradientová elektroforéza) je založena na změně jejich pohyblivosti v elektroforetickém gelu s gradientem denaturačního činidla (močovina, formaldehyd). Za konkrétně definovaných

podmínek denaturace je pak možné sledovat mikrobiální diverzitu. Obdobnou metodou je technika TGGE, která se od prvně uvedené odlišuje separací úseků nukleové kyseliny sledováním změn jejich pohyblivosti v gradientu teploty. Vyhodnocením elektroforeogramů (výsledek elektroforézy) se získává představa o druhové variabilitě mikrobiálních populací v místě lokality.

Implementace do sanačně-inženýrské praxe

Molekulárně-biologické metody představují řešení pro ty oblasti činnosti, které se opírají o využití mikrobiální aktivity. S ohledem na skutečnost, že přirozená atenuace, bioremediace a další biotechnologické přístupy v technické ochraně prostředí se ukazují jako schůdné řešení problémů řešení škod na životním prostředí, je potřeba hledat způsoby jak implementovat do spektra stávajících zavedených metod konvenční technické mikrobiologie postupy nové. Hlavním motivem pro toto úsilí je odstranění nepřesností pramenících z omezení, které kultivační metody mají. Možnost získat pohled na mikrobiální poměry konkrétní sanované lokality, jež budou výrazně objektivněji vypovídat o skutečném stavu a o skutečných změnách je cestou, která přispěje k prohloubení a rozšíření poznatků o využití biotechnologicky koncipovaných dekontaminačních metod a rozšíří jejich praktickou uchopitelnost.

Literatura

[1] COLWELL, R. R., GRIMES, D. J. (2000): **Nonculturable Microorganisms in the Environment**. ASM Press.