

STANOVENÍ, CHARAKTERIZACE A IDENTIFIKACE BIOREMEDIÁČNÍCH MIKROORGANISMŮ

Jana Chumchalová, Eva Podholová, Jiří Mikeš, Vlastimil Pištěk
EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice, e-mail: eps@epssro.cz

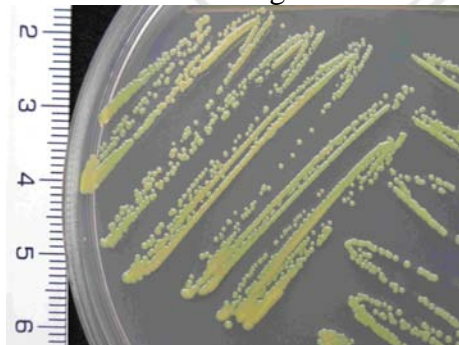
Abstrakt

Pro detekci biodegradačních mikroorganismů se používají metody založené na principu enzymové aktivity nebo celkové počty. 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 stanovení 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 biodegradačními schopnostmi a doplňovat tak firemní sbírku, ve které je nyní uloženo minimálně 150 původních prokaryotních a eukaryotních kultur, z nichž některé byly v minulosti úspěšně použity na lokalitách.

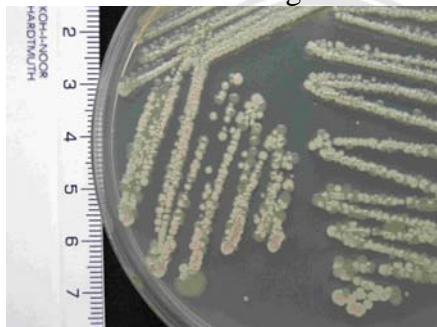
STANOVENÍ SKUPIN MIKROORGANISMŮ S BIODEGRADAČNÍMI SCHOPNOSTMI
mikroorganismy způsobující deamonifikaci, odsiřování, likvidující fosfor, degradující BTEX, MTBE, PCB a PAU, ...

Makrofotografie byly připraveny po kultivaci mikroorganismů na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 3-10 dní.

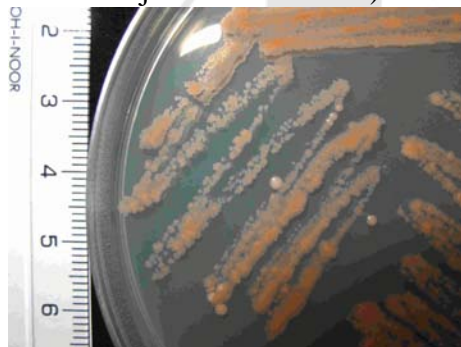
Obr. Detail morfologie kolonie izolátu **MTBE2** způsobujícího remediaci MTBE



Obr. 2 Detail morfologie kolonie izolátu **PAU1** způsobujícího remediaci PAU

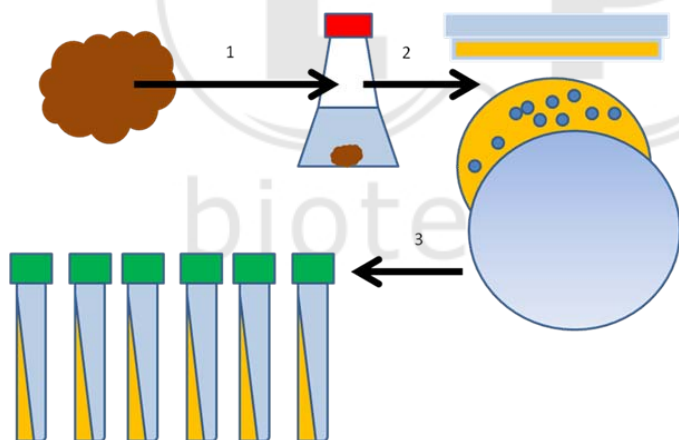


Obr. 3 Detail morfologie kolonie izolátu **BTEXB** způsobujícího remediaci BTEX (dva druhy kolonií? - je to konsorcium?)



IZOLACE MIKROORGANISMŮ S VYSOKÝM BIODEGRADAČNÍM POTENCIÁLEM A JEJICH CHARAKTERIZACE A IDENTIFIKACE FENOTYPOVÝMI A GENOTYPOVÝMI METODAMI

Obr. Schéma izolace mikroorganismu ze vzorku. 1) převedení vzorku půdy do ředícího roztoku a příprava ředění, 2) růst kolonií na agaru, 3) odběr sledovaného mikroorganismu

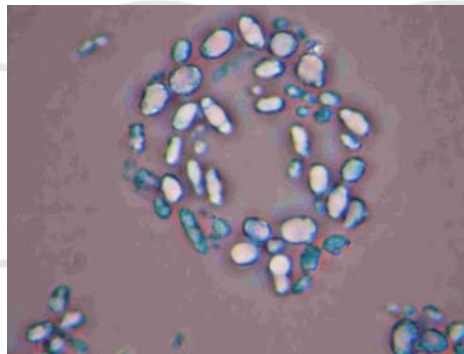
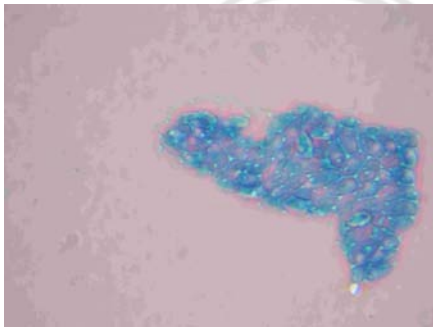


Charakterizace vlastností sledování využití oleje jako zdroj uhlíku a produkce biodetergentu

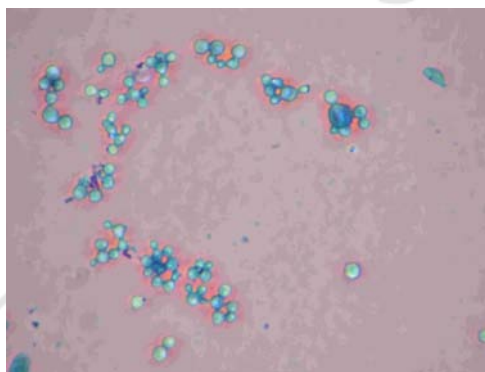
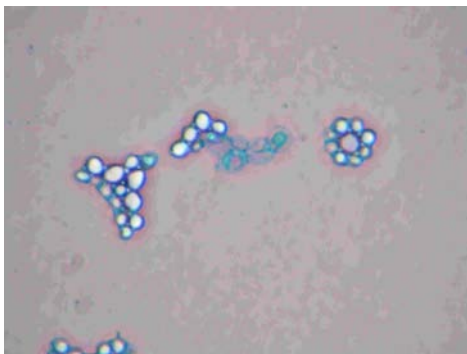
Mikrofotografie byly připraveny po fixaci buněk teplem a obarvení methylenovou modří podle Löfflera za použití imerzního objektivu ve fázovém kontrastu (Zvětšení 1000x).

Obr. Rozdíl ve vzhledu buněk po kultivaci a) na povrchu malt extrakt agaru 3-10 dní b) v minerálním mediu s řepkovým olejem a zdrojem dusíku 10-14 dní při otáčkách 100 ot/min. Kultivace probíhala vždy při pokojové teplotě za aerobních podmínek.

1) *Candida utilis*



2) *Debaryomyces hansenii*



ULOŽENÍ IZOLÁTŮ S BIOREMEDIÁČNÍMI SCHOPNOSTMI VE SBÍRCE MIKROORGANISMŮ A JEJICH POUŽITÍ

Sbírka:

minimálně 150 prokaryotních a eukaryotních kultur 50 rodů (např. *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Variovorax*)

Použití:

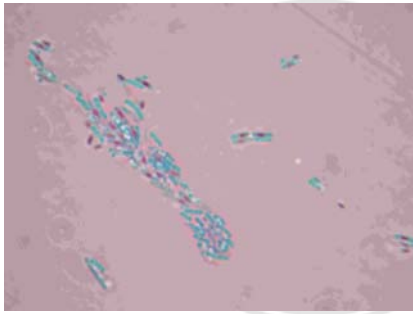
- základ pro vývoj bioaugmentačních preparátů;
- na kontaminovaných lokalitách (ropné látky, chlorované uhlovodíky, ftaláty apod.);
- řešení projektů technické ochrany životního prostředí jako např. sanační práce v režimu bioremediace (*in situ* realizace, *ex-situ* aplikace při dekontaminaci různých matric na zabezpečených plochách (landfarming);
- pro výrobu bioplynu s jeho výrazně vyšším výtěžkem (rozklad lignocelulosového materiálu).

Používané metody:

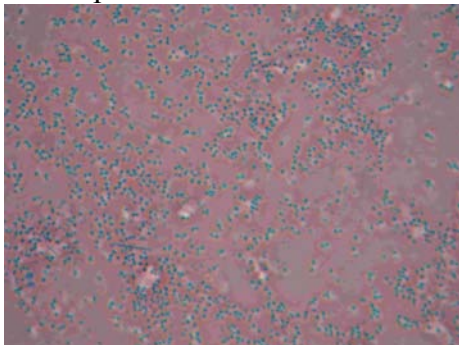
Světelná mikroskopie

Mikrofotografie byly připraveny po fixaci buněk teplem a obarvení methylenovou modří podle Löfflera za použití imerzního objektivu ve **fázovém** kontrastu (Zvětšení 1000x).

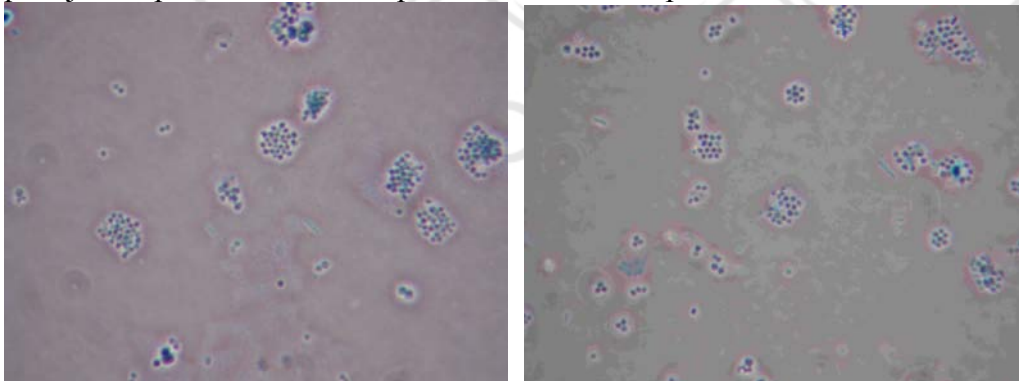
Obr. 1 Buněčná morfologie izolátu AI4 (**AI4FM100a**) po kultivaci na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 3-10 dní.



Obr. 2 Buněčná morfologie *Pseudomonas putida* atyp OASP3 (OASP3FM100) po kultivaci v minerálním mediu s živným mediem a ropou při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 30 dní při otáčkách 100 ot/min.

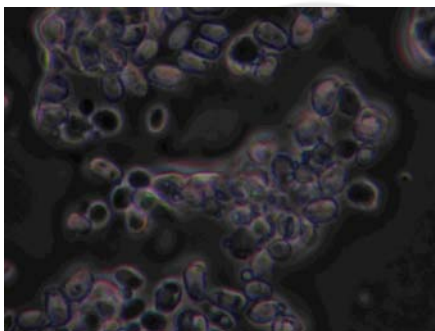


Obr. 3 Buněčná morfologie *Variovorax paradoxus* V21 (Variovorax FM100b, 100c - spojité tyčinka - kontaminace?) po kultivaci v minerálním mediu s živným mediem a ropou při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 30 dní při otáčkách 100 ot/min.



Obr. 4 Buněčná morfologie *Yarrowia lipolytica* - Čepro (YarrowiaFM100) po kultivaci na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 3-10 dní.

EPS
biotechnologie



PS

biotechnologie

Fluorescenční mikroskopie

- stanovení živých a mrtvých bakterií,
- stanovení živých a mrtvých kvasinek,
- stanovení celkového počtu mikroorganismů

Identifikace biodegradčních mikroorganismů metodou FISH

Obr. 1 Buněčná morfologie *Yarrowia lipolytica* - Čepro (snapshot55) po kultivaci na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 3-10 dní nebo z třepačky?.

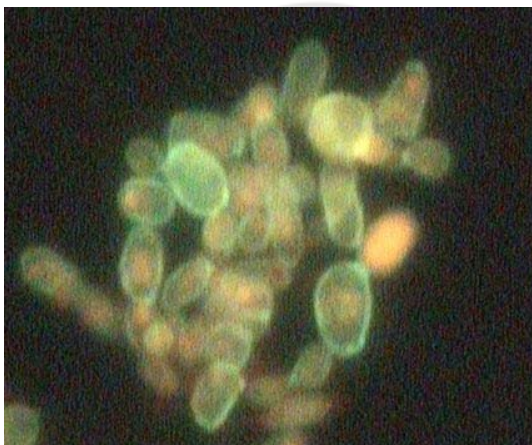
Barveno Calcofluorem White M2R, který modře obarví okraje metabolicky aktivních buněk. Pozorováno pod fluorescenčním nástavcem za použití imerzního objektivu (Zvětšení 1000x).



Obr. 2 Buněčná morfologie *Yarrowia lipolytica* - Čepro (snapshot62) po kultivaci na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 3-10 dní. Barveno Fun 1, který modře obarví okraje metabolicky aktivních buněk. Pozorováno pod fluorescenčním nástavcem za použití imerzního objektivu (Zvětšení 1000x). Žlutozelené zbarvení signalizuje mrtvé buňky, živé a metabolizující buňky mají oranžovo-červené zbarvení či částečně obarvené intravakuolární struktury do žluto-oranžového odstínu.

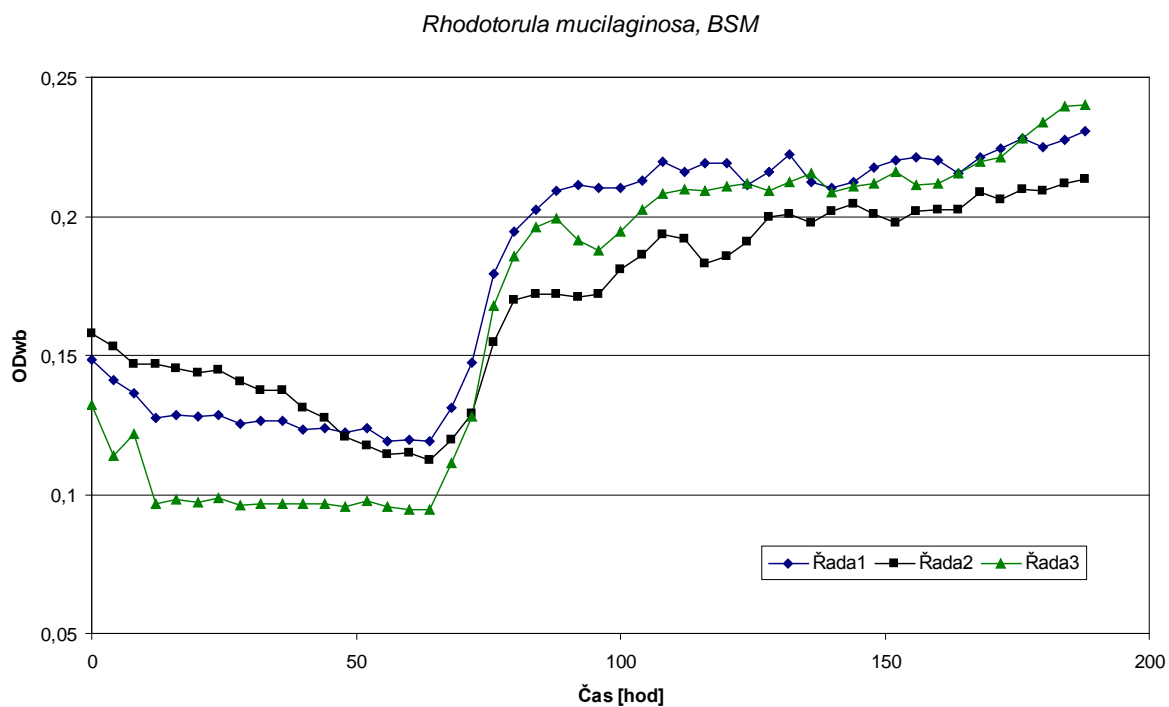
EPS

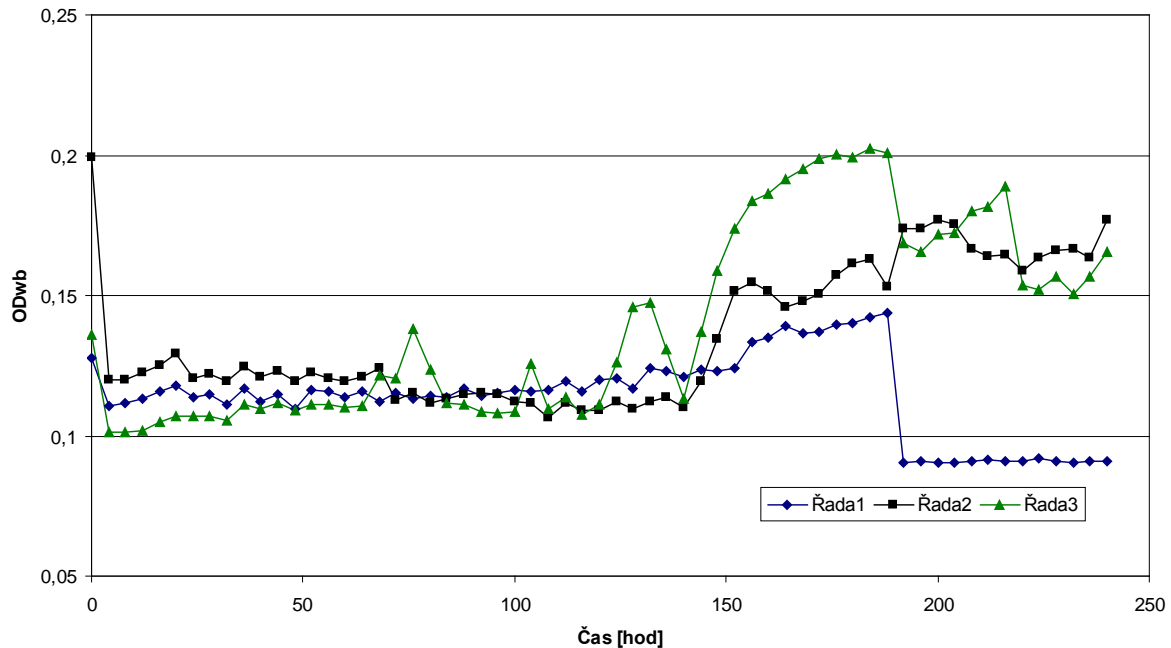
biotechnologie



Spektrofotometrie

Obr. Vliv různých zdrojů uhlíku na růst *Rhodotorula mucilaginosa* v minerálním mediu (BSM) a v minerálním mediu se zdrojem dusíku (YNB): řada 1) 1g/l řepkového oleje, řada 2) 10 g/l řepkového oleje, řada 3) 1g/l benzínu. Příklad měření na přístroji Bioscreen.





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. Toto úsilí je předmětem výzkumně-vývojových aktivit podpořených z podpory státními prostředky (MPO – program TIP), nicméně i v rámci interních vývojových aktivit se stále hledají 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.

Poděkování

Společnost EPS, s.r.o. děkuje poskytovateli grantové podpory, jímž v tomto případě je Ministerstvo průmyslu a obchodu svým programem podpory výzkumu a vývoje TIP. Vývoj nových bioaugmentačních prostředků je financován z podpory FR-TI1/318 s názvem *Vývoj komerčně dostupných remediačních biopreparátů určených k přímé aplikaci na difúzně kontaminované lokality.*