

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@epsro.cz



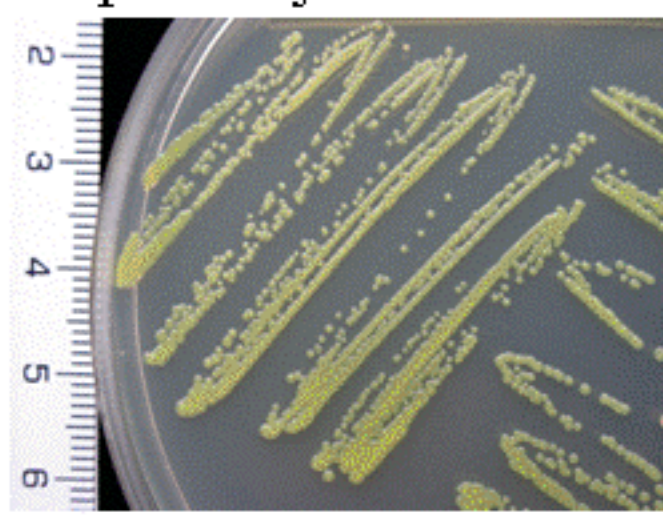
Abstrakt

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 rozbořích 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.

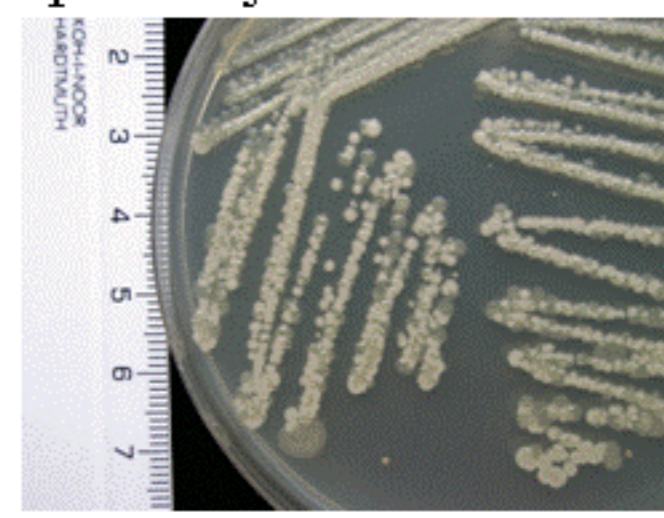
STANOVENÍ SKUPIN MIKROORGANISMŮ S BIODEGRADAČNÍMI SCHOPNOSTMI

mikroorganismy způsobující deamonifikaci, odsiřování, likvidující fosfor, degradující BTEX, MTBE, PCB, PAU, ...

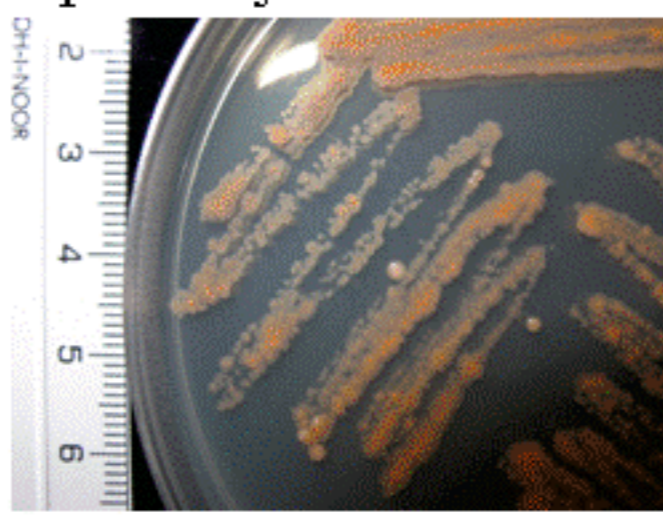
Obr. 1 Kolonie izolátu MTBE2 způsobujícího remediaci MTBE



Obr. 2 Kolonie izolátu PAU1 způsobujícího remediaci PAU



Obr. 3 Kolonie izolátu BTEXB způsobujícího remediaci BTEX



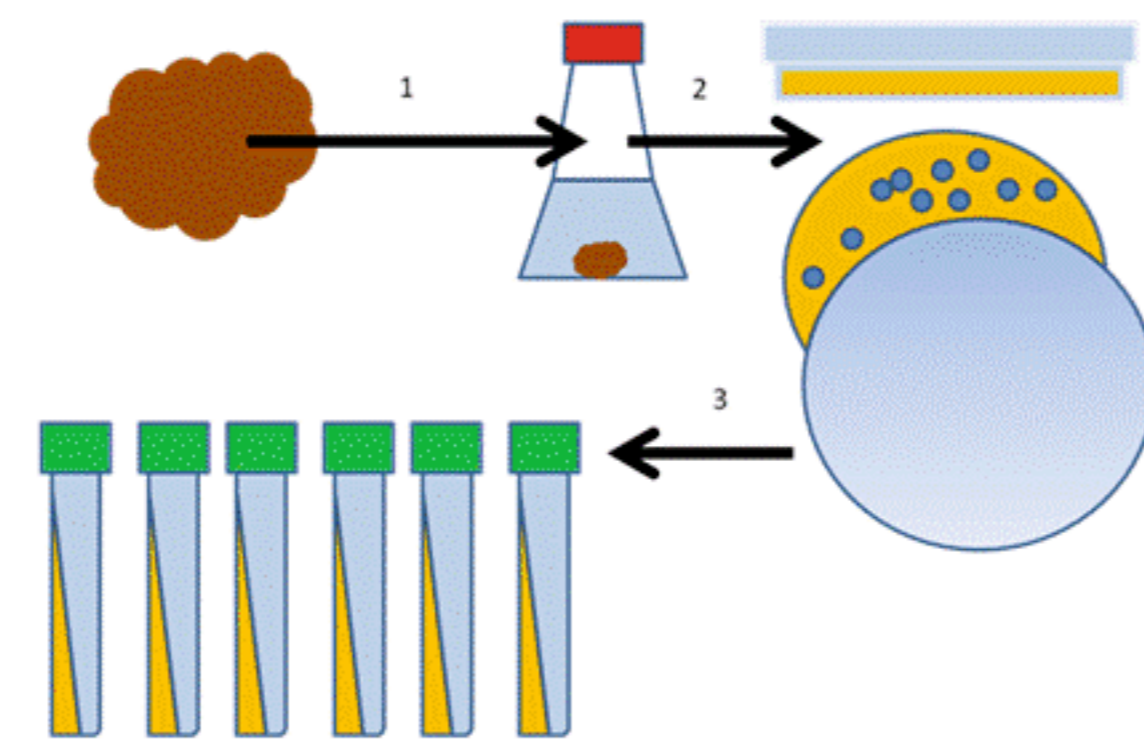
Makrofotografie znázorňující detaily morfologie kolonií byly připraveny po kultivaci mikroorganismů na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek po dobu 3-10 dní.

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

Izolace mikroorganismů z různých zdrojů

Obr. 4 Schéma izolace mikroorganismu ze vzorku

- 1 - převedení vzorku půdy do ředícího roztoku a příprava ředění,
- 2 - růst kolonií na agaru,
- 3 - odběr sledovaného mikroorganismu.



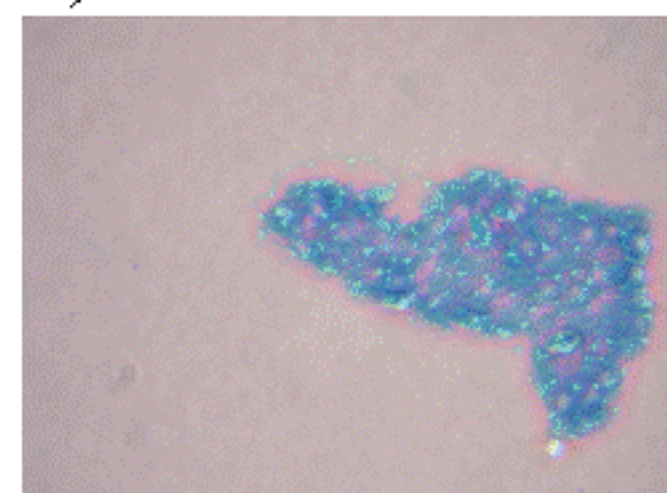
Charakterizace vlastností

např. sledování využití oleje jako zdroje uhlíku a produkce biodetergentu

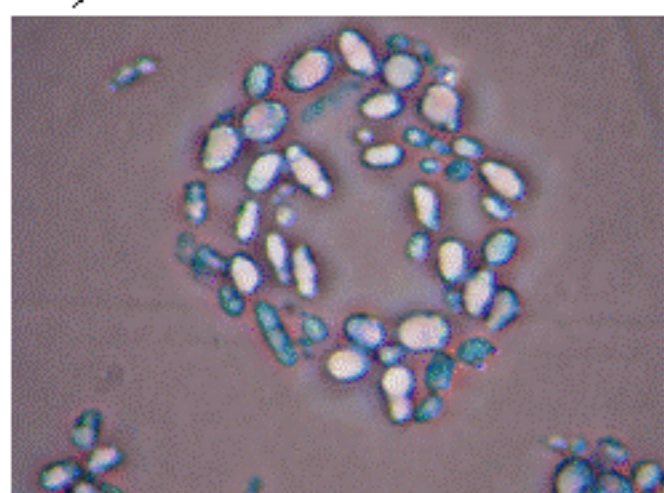
Obr. 5 Rozdíl ve vzhledu *Candida utilis* a *Debaryomyces hansenii* po kultivaci a) na povrchu malt extrakt agaru 3-10 dní a b) v minerálním mediu s řepkovým olejem a zdrojem dusíku 10-14 dní za míchání (100 ot/min) Kultivace probíhala při pokojové teplotě za aerobních podmínek.

Candida utilis

a)

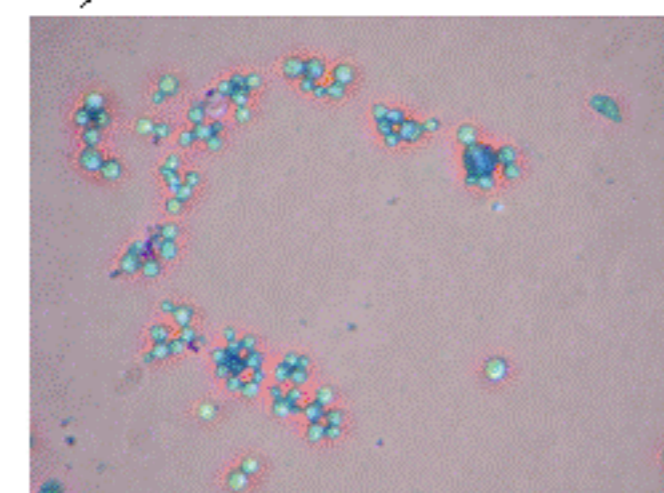


b)

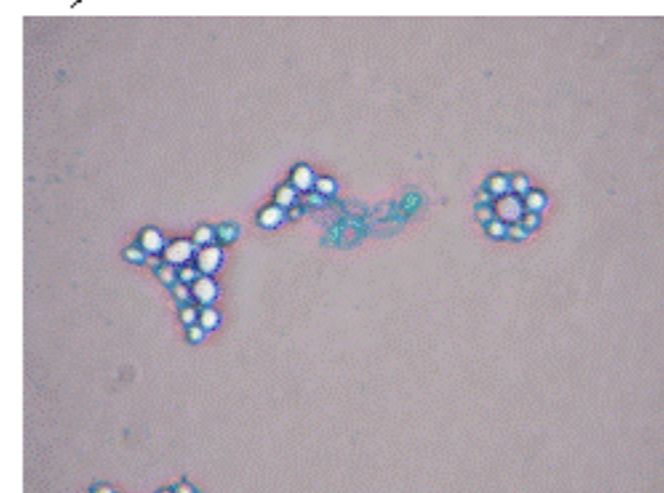


Debaryomyces hansenii

a)



b)



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

ULOŽENÍ IZOLÁTŮ S BIOREMEDIÁČNÍMI SCHOPNOSTMI VE SBÍRCE MIKROORGANISMŮ A JEJICH POUŽITÍ

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

Použití kmenů:

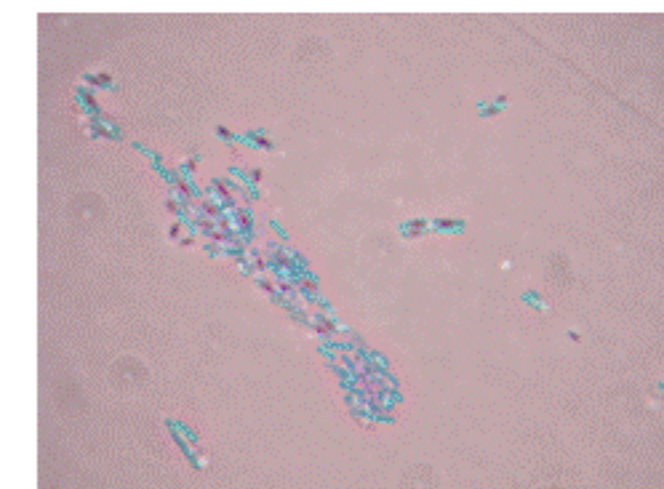
- základ pro vývoj bioaugmentačních preparátů;
- na kontaminovaných lokalitách (ropné látky, chlorované uhlovodíky, ftaláty apod.);
- řešení projektů technické ochrany životního prostředí jako např. sanační práce v režimu bioremediace (*in situ* realizace, *ex-situ* aplikace při dekontaminaci různých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

POUŽÍVANÉ METODY

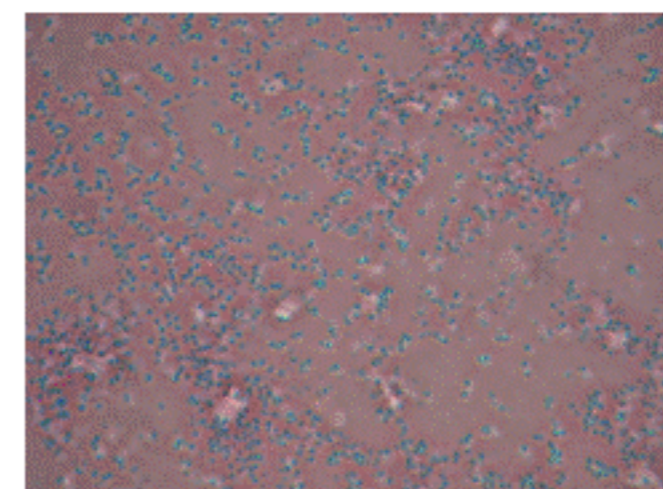
Světelná mikroskopie

- Obr. 6 Izolát AI4 po kultivaci na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek asi 3-10 dní
Obr. 7 *Pseudomonas putida* atyp OASP3 po kultivaci v minerálním mediu s živným mediem a ropou při pokojové teplotě za aerobních podmínek po dobu 30 dní za míchání (100 ot/min)
Obr. 8 *Variovorax paradoxus* V21 po kultivaci v minerálním mediu s živným mediem a ropou při pokojové teplotě za aerobních podmínek po dobu 30 dní za míchání (100 ot/min)
Obr. 9 *Yarrowia lipolytica* - Čepro po kultivaci na povrchu živného agaru při pokojové teplotě za aerobních podmínek po dobu 10 dní

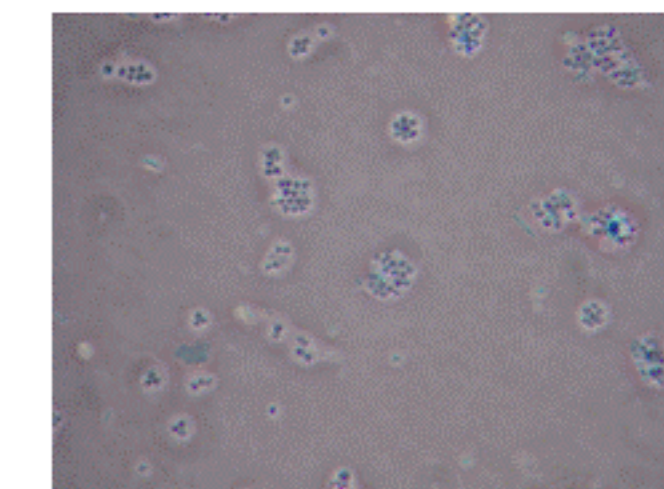
Obr. 6



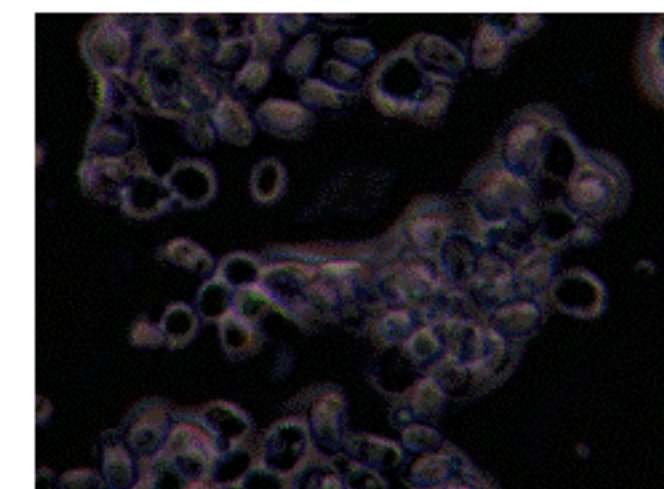
Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9



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

Fluorescenční mikroskopie

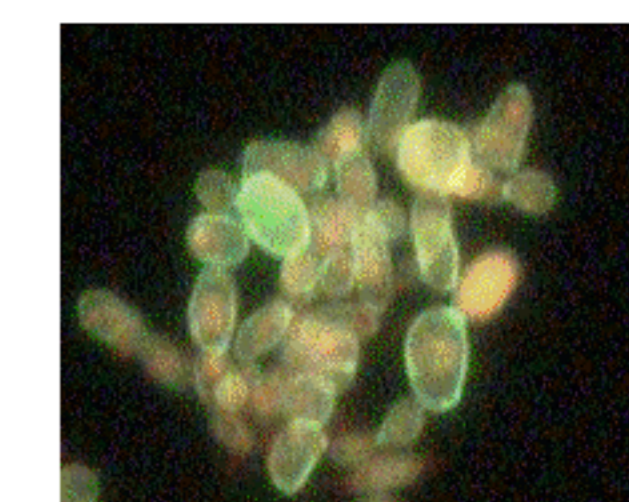
- stanovení živých a mrtvých bakterií;
- stanovení živých a mrtvých kvasinek;
- stanovení celkového počtu mikroorganismů;
- identifikace biodegradačních mikroorganismů metodou FISH.

Obr. 10 Buněčná morfologie *Yarrowia lipolytica* - Čepro po kultivaci při pokojové teplotě za aerobních podmínek po dobu 10 dní za míchání (100 ot/min) pozorovaná pod fluorescenčním nástavcem za použití imerzního objektivu (zvětšení 1000x)

a - barveno Calcofluorem White M2R, který modře obarví okraje metabolicky aktivních buněk.

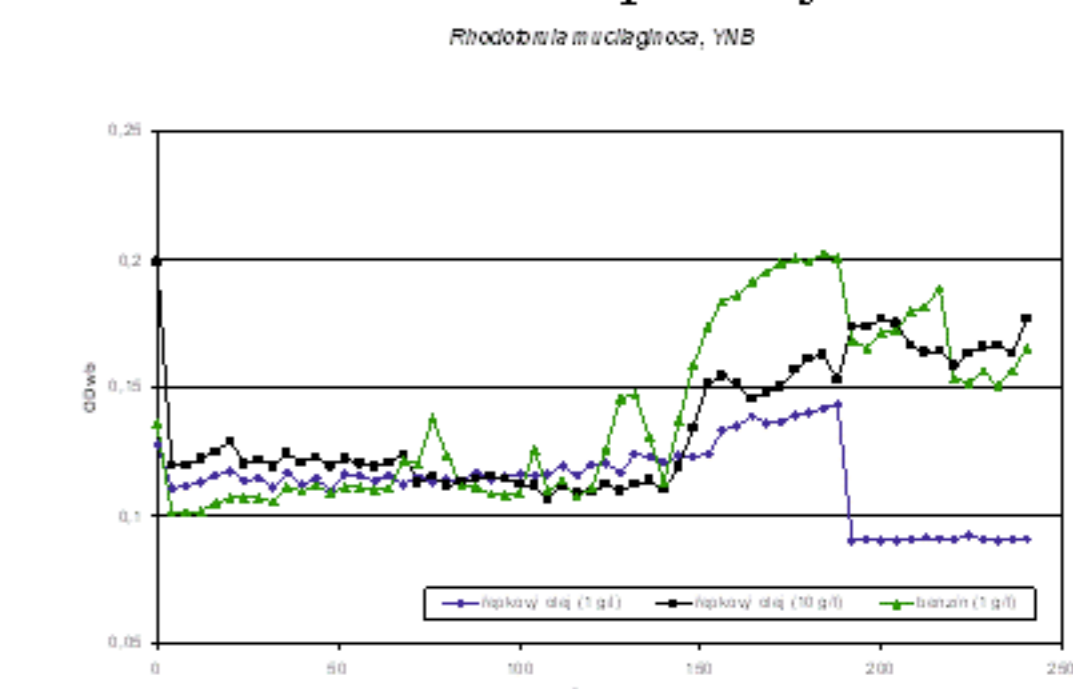
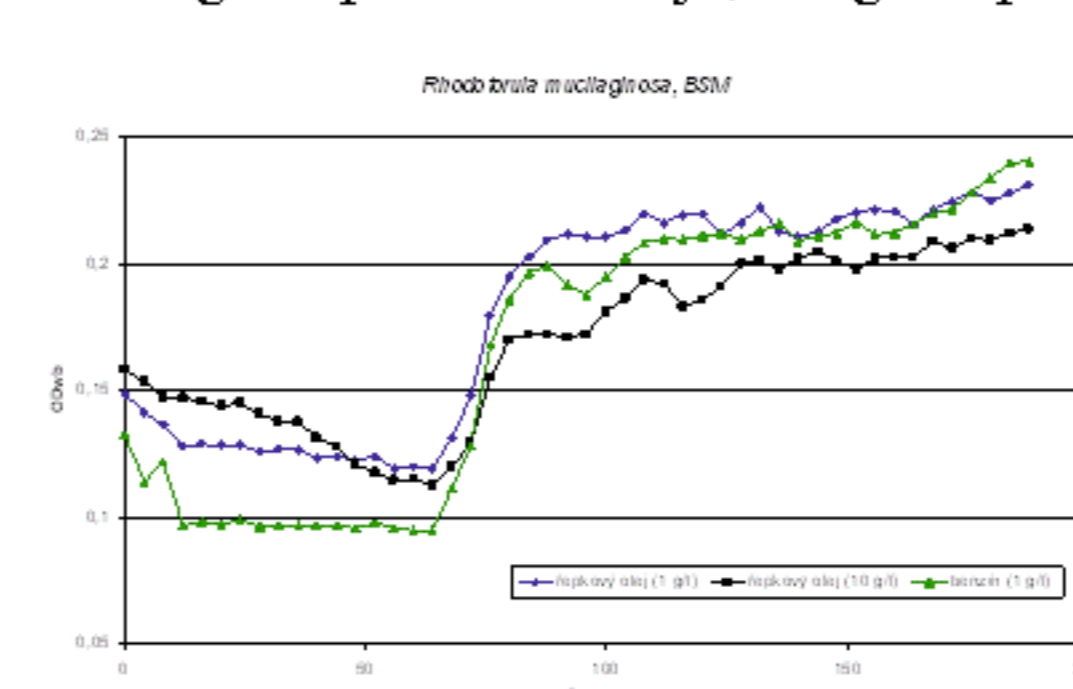


b - barveno Fun 1, který modře obarví okraje metabolicky aktivních buněk. Žlutozelené zabarvení signalizuje mrtvé buňky, živé a metabolizující buňky mají oranžovo-červené zabarvení či částečně obarvené intravakuolární struktury do žluto-oranžového odstínu.



Spektrofotometrie

Obr. 11 Vliv různých zdrojů uhlíku na růst *Rhodotorula mucilaginosa* v minerálním mediu (BSM) a v minerálním mediu se zdrojem dusíku (YNB) 1g/l řepkového oleje, 10 g/l řepkového oleje, 1g/l benzínu. Příklad měření na přístroji Bioscreen C.



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 důležitě kontaminované lokality.*

WWW.EPSSRO.CZ

WWW.EPSSRO.CZ

WWW.EPSSRO.CZ