

## Anaerobní mikrobiologické techniky pro bioremediační aplikace

Mikroorganismy, které dovedou proměňovat látky nebezpečné pro životní prostředí v takové sloučeniny, jejichž rizikovost je výrazně nižší, v mnoha případech nesnášejí vzduch, zejména kyslík. Jedná se o tzv. anaerobní mikroorganismy. Tato jejich vlastnost musí být zákonitě zohledněna při jakékoliv práci s nimi, ať již se jedná o prostou analýzu jejich přítomnosti ve vzorku, ale především o objektivní zjištění jejich funkčních schopností, izolaci, konzervaci a optimalizace technologických parametrů. Práce s nimi proto musí být prováděna v anaerobním boxu.

Anaerobní box můžeme nejjednodušeji charakterizovat jako box opatřený vstupem pro ruce operátora (mikrobiologa), průhlednou stěnou, osvětlením, ale především systémem, který dokáže z vnitřní části odsát vzduch s kyslíkem a nahradit ho inertním plynem (např. dusíkem, ale často konkrétní směsí plynů). Pro potřeby vlastní práce musí existovat možnost

trice izolují mikroorganismy, které jsou kultivovatelné za podmínek technické mikrobiologie na ztužených kultivačních půdách v podobě agarů, ale také v kapalných kultivačních médiích, z nichž byl odstraněn kyslík.

Výsledkem těchto prací bývá základní kvantifikace mikrobiálního osídlení, jeho izolace na konkrétní taxonomické jed-

ce není ani tak identifikování, o jaký rod, druh a jiné taxonomické zařazení v konkrétním případě jde, ale především analýza funkčních schopností. Rozumí se jí především zařazení z hlediska preferovaného terminálního akceptoru elektronů (dusičnany, sírany, oxid uhličitý, kovy apod.), která v sobě nese zásadní informaci pro koncepci případného technologického opatření. V této fázi práce v anaerobním boxu rovněž umožňuje provést zjištění koncentračních limitů metabolicky významných látek pro izolované kmeny.

Díky promyšlené a ověřené technice je možné využít mikrokultivačních zařízení se zabudovanými readry, které za definovaných podmínek poskytnou profil růstové kinetiky označovaný růstovou křiv-



Obrázek: Anaerobní box a práce v něm ve výzkumných laboratořích EPS, s. r. o.

vstupu do zařízení tzv. přestupovou komorou (na obrázku pravá část boxu), již mohou být vzorek, nádoby, pomůcky a pracovní roztoky přeneseny dovnitř.

Škála prací, jež je v anaerobním boxu možné provádět, je široká. Do určité míry lze tvrdit, že jakákoliv operace prováděná s aerobními mikroorganismy, je přizpůsobitelná pro podmínky anaerobní. V první řadě se jedná o základní operace, kdy se ze vzorku pocházejícího z půdy, sedimentu nebo jiného typu ma-

notky (mikrobiální kmeny) a vznik tzv. technicky čistých kultur, tedy kultur, jejichž základem je izolovaná, dostatečně vzdálená a dobře ohraničená mikrobiální kolonie. Tento biologický materiál je následně možné umístit do nádobek s anaerobními podmínkami a po spolehlivě těsném uzavření obdržet vzorky biologických činitelů z analyzovaných vzorků.

Tímto ovšem okruh prací, jež je v anaerobním boxu možné provádět, nekončí. Velice důležité pro technologické aplika-

kou. V rámci těchto experimentů se může modulovat nejenom koncentrace substrátu, terminálního akceptoru, ale také podpůrných nebo na druhou stranu inhibičních látek, s nimiž se testovaný mikroorganismus v prostředí může setkat.

Jako konkrétní příklady mohou být uvedeny povrchově aktivní látky, ionty toxických prvků, případně jiné mikroorganismy v rámci ekologické studie. Klíčem k úspěšné realizaci těchto zkoušek není mikrokultivační zařízení s anaerob-



ní atmosférou, ale schopnost dokonale utěsnit mikrotitrační destičku.

Stejně tak může anaerobní box umožnit analýzu na mikrotitračních destičkách se spektrem diagnosticky zvolených substrátů pro poskytnutí uceleného profilu o schopnostech testovaného kmene využívat nebo nevyužívat konkrétní látky v rámci svého metabolismu. Ve větších objemech (řádově do 1 – 2 litrů) mohou být provedeny anaerobní kultivace vsádkového typu tak, že splňují veškeré nároky, které daný mikroorganismus vyžaduje k tomu, aby reprodukoval svoje buňky do požadovaného množství biomasy.

Zcela specifickým typem analýz anaerobních mikroorganismů je jejich bioanalytický rozbor. Částečně již byly zmíněny v předcházejícím odstavci v textu o biochemických zkouškách. Na tomto místě je však zamýšleno především spojení anaerobní mikrobiologie s mikroskopickými technikami a jejich funkčními analýzami, které se opírají o principy fluorescenční mikroskopie.

Ze všech vzorků kultivovatelných mikroorganismů izolovaných z matric životního prostředí za anaerobních podmínek mohou být pořízeny fotografie z mi-

kroskopu. Nadstavbou k těmto technikám jsou fotodokumentační výstupy, které znázorňují analyzované mikroorganismy z hlediska svých fyziologických a metabolických projevů.

Jako konkrétní příklad je možné uvést aplikaci fluorescenčních sond, které charakterizují zkoumané buňky mikroorganismů z hlediska jejich vitality a viability. Jedná se o unikátní aplikaci kitů *live/dead staining* (LDS) za účelem zjištění rozmanitých vlivů látek a parametrů prostředí na fyziologický stav.

V rámci anaerobní mikrobiologie představuje nejcennější výstup pro aplikační sféru test senzitivity vůči expozici vzduchem, který je možné technikou LDS velmi přesvědčivě zdokumentovat ve sledovaných intervalech pomocí řízené expozice. Technologický význam těchto zkoušek je nezastupitelný z hlediska hledání odpovědi, do jaké míry je nutné koncipovat technologické řešení právě z hlediska možnosti styku biologického činitele se vzduchem.

Jiným okruhem zkoušek jsou FISH metody prováděné na anaerobních izolátech. Tzv. fluorescenční in situ hybridizace je poměrně robustním analytickým apará-

tem, díky kterému mohou být potvrzeny nebo vyvráceny hypotézy o možných metabolických schopnostech, např. cílení pozornosti na denitrifikující mikroorganismy.

Vzhledem ke skutečnosti, že přirozené biogeochemické cykly jsou hnacím motorem koloběhu hmoty na Zemi, představuje potenciál anaerobně respirujících bakterií obrovský rejstřík nástrojů pro zefektivnění levné cesty dočištění kontaminovaných lokalit. Síla denitrifikačních, sírany redukujících nebo methanogenních konsorcií se neprávem přehlíží a věnuje se jí nedostatek pozornosti.

Fakt, že anaerobní procesy jsou výkonnově slabší, však v žádném případě nebrání hledání cest procesní intenzifikace, která však není možná, pokud není známa podstata mikrobiálního osídlení daného systému kontaminovaného prostředí a její funkční schopnosti doložené na přesvědčivých a objektivních důkazech.

*Juraj Grígel, Miroslav Minařík*  
EPS, s. r. o.  
[miroslav.minarik@epsro.cz](mailto:miroslav.minarik@epsro.cz)



## ANAEROBIC

*Laboratoř vybavená pro práci za podmínek bez přítomnosti vzduchu, v prostředích se zápornými hodnotami redoxního potenciálu pro široké spektrum biotechnologických aplikací*

*EPS, s.r.o. nabízí zcela unikátní soubor služeb v oblasti anaerobní mikrobiologie, jejích biotechnologických aplikací a konzervace anaerobních biologických činitelů:*

- Zpracování vzorků horninového prostředí
- Zpracování vzorků z procesů anaerobní digesce
- Příprava suspenzí anaerobních mikroorganismů
- Diagnostika základních typů funkčního metabolismu
- Optimalizace kultivačních procesů a jejich technických parametrů
- Příprava vzorků pro molekulárně-biologickou analýzu
- Konzervace vhodných biologických činitelů



*Komu jsou tyto služby určeny:*

- Vysokým školám a výzkumným organizacím (např. formou společných projektů výzkumu, vývoje a inovací)
- komerčním subjektům z oblasti environmentálního servisu
- potravinářským firmám (fermentační procesy)



EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice, [eps@epsro.cz](mailto:eps@epsro.cz), [www.epsro.cz](http://www.epsro.cz)