

FLUORESCENCE MICROSCOPY FOR THE STUDY OF BIOREMEDIATION PROCESS UNDER ANAEROBIC CONDITIONS

VYUŽITÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE PRO STUDIUM BIOREMEDIATIONŮ PROCESŮ ZA ANAEROBNÍCH PODMÍNEK

Jiří Mikeš¹⁾, Juraj Grígel¹⁾, Jitka Dostálková¹⁾, Kristina Turnvaldová¹⁾, Vlastimil Pištěk¹⁾, Elyes Lariani²⁾, Petr Beneš²⁾

1) EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice, Czech Republic, e-mail: eps@epssro.cz

2) Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, 166 28 Praha 6, Czech Republic

Abstract:

In this study, several cases of anaerobic transformation in terms of vitality, viability and proliferation of biological factors involved in these processes were observed. In the first case, denitrification and sulfate reduction of oil biodegradation provide a good experimental scope. We also investigated the viability of the strain *Yarrowia lipolytica* under anaerobic conditions as a representative agent able to be a fermentation agent in the elimination of non-polar substances. The improvement of development tools in this functional analysis of microbial dehalogenation fluorescence microscopy was deployed for additional confirmation of the viability of dehalogenation and fermentation groups of bacteria in real samples from CHC site. The culmination of this work is a view on manganese reducing bacteria (MRB) in the presence of chlorinated ethylene and the correlation of their vitality and biodegradation performance. Outcomes of this study show fluorescence microscopy and its analytical dimension in the service of bioremediation practice

Key words:

Fluorescence microscopy, anaerobia, live/dead cell diagnostics

Abstrakt:

V této studii bylo sledováno několik případů anaerobní transformace z hlediska vitality, viability a proliferace biologických činitelů podílejících se na těchto dějích. V prvním případě v oblasti denitrifikační a sulfátově redukční biodegradace ropných látek. Dále byla studována životaschopnost kmenu *Yarrowia lipolytica* v anaerobním kultivačním systému jako reprezentativního zástupce schopného uplatnit fermentační děje v odbourávání nepolárních látek. V rámci zdokonalování vývoje nástroje funkční analýzy systému mikrobiální dehalogenace byla fluorescenční mikroskopie nasazena na doplňkové potvrzování životaschopnosti dehalogenačních a fermentačních skupin bakterií v reálných vzorcích. Završením práce je pohled na bakterie redukující mangan (MRB) v přítomnosti chlorovaných ethylenů a na korelaci jejich vitality a biodegradčního výkonu. Výstupy studie ukazují fluorescenční mikroskopii a její analytický rozměr ve službách bioremediační praxe.

Klíčová slova:

Fluorescenční mikroskopie, anaerobie, živé/mrtvé buňky, diagnostika

Úvod

Rozměr bioremediačních procesů je rozmanitý jak do počtu konkrétních metabolických transformací, tak také z hlediska pestrosti zúčastněných mikrobiálních taxonů. Nikoliv nevýznamnou roli sehrávají v komplexním systému přeměny škodlivých látek do jejich méně toxické podoby také děje nastávající bez přítomnosti kyslíku nebo za jeho přítomnosti, ale minimálního vlivu na příslušný metabolismus. Právě z těchto důvodů je pro objektivní charakterizaci, bilanci a praxi nutné přistupovat zodpovědně v rovině prováděných rozborů, zkoušek a analýz. Týká se to tzv. anaerobní mikrobiologie, která reprezentuje specifickou část mikrobiologie závislé na speciálním vybavení (anaerobní boxy, kultivátory a indikátory). Významně však může v těchto činnostech napomoci i fluorescenční mikroskopie, ne tak jako zobrazovací metoda, ale především jako nástroj, který potvrdí nebo vyloučí předpoklady, že se daný mikroorganismus nebo jejich společenstvo v určitých procesech vyskytuje ve své živé (vitální) formě a je skutečným prostředkem přeměny kontaminantu.

Technická mikrobiologie trpí řadou omezení, která se projevují nedostatečným informačním tokem, jsou-li tyto postupy aplikovány na studium mikrobiálních procesů v kontaminovaných systémech. Je zřejmé, že řadu z nich dokáže uspokojivě eliminovat používání technických zařízení pro anaerobní mikrobiologii (glovebox, inertní atmosféra v kultivačních systémech). Na druhou stranu potřeba rychle se rozhodnout, jak dále postupovat v konkrétním řešení sanačního zákroku, vyžaduje hledat a vyvíjet nástroje, které budou investičně výrazně méně nákladné a především uživatelsky natolik jednoduché, aby bylo možné obdržet zásadní odpovědi na některé otázky popsané výše.

Fluorescenční sondy, jejich rozmanitost a snadná použitelnost vedly k rychlému zavedení do mikroskopie. Zpočátku především jako prostředek vizualizace, ovšem vzápětí následovaný posunem do oblasti analytické. Typickým příkladem může být soubor fluorescenčních barviv, která dokážou oddělit živé a mrtvé buňky mikroorganismů ve studovaném vzorku (Boulos et al., 1999; Lafleur, 2006). Logicky prvním nabízejícím se využitím uvedených metod na bázi *live-dead staining* je zjišťování kvality mikrobiálních suspenzí, v bioremediační praxi zejména tzv. bioaugmentačních preparátů. Grígel (Grígel a kol., 2012) podává ucelený metodologický rámec dokumentovaný na konkrétních příkladech. S přihlédnutím k faktu, že barevná reakce indikující viabilitu testovaných mikroorganismů je diametrálně odlišná v případě bakterií a kvasinek¹, nabízí se další rozměr praktického využití pro analýzu podílu zastoupení prokaryotních (bakterie) a eukaryotních mikroorganismů v kultivačních a přirozených systémech. Dalším polem působnosti těchto technik je možná simulace různých letálních účinků, konkrétně expozice kyslíkem v případě anaerobních mikroorganismů, životaschopnost konkrétních mikroorganismů v podmínkách jiných než pro ně obvyklých (např. potvrzení fakultativního rozměru metabolismu u kvasinek), popř. zjištění toxického efektu některých chemických sloučenin na mikroorganismy. Užitek těchto informací je velmi široký. Objektivnější poznání preferovaného kultivačního režimu představuje cenné informace pro technologickou praxi, v případě fakultativních mikroorganismů spočívá význam těchto zjištění ve znalosti míry senzitivity k expozici kyslíku, k níž může dojít během technologických a sanačních prací. Naopak zjištění toxického efektu chemických látek je snadnou cestou pro poznání ještě tolerovaných koncentračních hladin prakticky všech typů environmentálních kontaminantů, což otevírá širokou možnost využití v ekotoxikologických aplikacích. Vedle konvenčně používaného preparátu postaveného na autofluorescenci mořské bakterie *Vibrio fischeri* (Doe et al., 2005) by se tak mohlo jednat o nový rozměr holistického studia vlivu cizorodých chemických látek na biotu s užitečným podpůrným významem pro řadu environmentálních rizikových studií.

V rámci uceleného pohledu na možnosti fluorescenční mikroskopie si svůj prostor zasluhuje rovněž diagnostický rozměr odvozený z tzv. fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). V zásadě se jedná o metodu cytogenetickou, v jejímž rámci dochází k obarvení chromosomů nebo jejich konkrétních částí. Specifická barviva (fluorochromy) se vážou na konkrétní sekvenci bází v DNA (ovšem existuje i RNA-FISH, která selektivně interaguje s druhým typem nukleových kyselin). Může se jednat o 500 000 až 10 000 000 nukleotidů v rámci nukleové kyseliny. V případě proběhnutí vazby na bázi komplementarity bází nastane po expozici světlem určité vlnové délky emise fluorescence, která je vizualizovatelná ve fluorescenčním mikroskopu. Velký význam získaly FISH sondy v cílené diagnostice indikačních skupin mikroorganismů jako např. sulfát redukující bakterie, denitrifikující společenstva, rod *Thiobacillus*, pučící kvasinky apod. (Beatty, Mai, Squire, 2002).

Cílem předkládané studie je předně ověření životaschopnosti převážně anaerobně respirujících a fakultativně fermentujících skupin mikroorganismů v jednoduchých typech kultivačních systémů na bázi různě velkých skleněných nádob uzavřených víčky s vratně propichovatelným teflonovým septem. Dále studie způsobilosti využití kitů na bázi *live-dead staining* (LDS) v rámci jednoduchého odlišení kvasinkových a bakteriálních (kultivovatelných) populací, jejímž účelem je posouzení praktické aplikovatelnosti v rutinních operacích technické mikrobiologie. Konečně posledním významným

¹ Podrobnější vysvětlení principů a popis chování vzorku po fluorescenčním barvení je přístupný na <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes/Key-Molecular-Probes-Products/LIVE-DEAD-Viability-Brand-Page/LIVE-DEAD-Cell-Viability-Selection-Guide.html>

tématem je aplikace v rámci řízené expozice potenciálně letálním faktorem v podobě kyslíku na anaerobně respirující a fermentující konsorcia technologicky významných skupin mikroorganismů.

Materiály a metody

Denitrifikační a sulfátově-respirační biodegradace: Kultivace ve 250 ml mikrokosmu zeminy znečištěné ropnými látkami s přísadou dusičnanu sodného a síranu sodného za účelem vytvoření selektivního tlaku v podmínkách simulující horninové prostředí s podzemní vodou. Zvlhčení systému bylo provedeno sterilní destilovanou vodou. Stejný systém byl po 7 dnech řízeně exponován injektáží vzduchu.

***Yarrowia lipolytica* v anaerobních podmínkách:** Biomasa studovaného kvasinkového taxonu se nakultivovala za aerobních podmínek v YNB, následně byla separována centrifugací a vytvořena suspenze ve fyziologickém roztoku o přibližné koncentraci 10^{10} cfu/ml. Anaerobně byla převedena pomocí injektáže do uzavřeného (vzduchu zbaveného) kultivačního systému sestávajícího z YNB a 1 g.l^{-1} glukosy a rostlinného oleje.

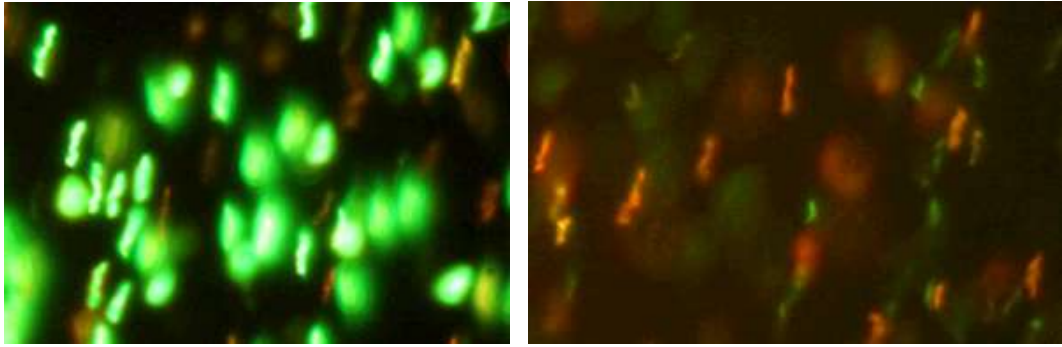
Fermentační a dehalogenační konsorcia: V uzavřeném mikrokosmu o objemu 50 ml (vialky) v BSM médiu s přísadou 1 g.l^{-1} mléčné kyseliny a 100 mg.l^{-1} TCE se kultivovalo mikrobiální společenstvo z lokality Karosa Vysoké Mýto po 5 dní. Stejný systém byl po uplynutí této doby exponován řízenou dávkou vzduchu.

MRB: Intaktně a anaerobně odebrané vzorky z mikrokosmu za účelem enumerace kultivovatelného počtu mikroorganismů v 5 ml vialkách s anaerobní atmosférou a živným agarem poskytly vhodný biologický materiál pro kvantifikaci živých buněk a pro experiment s řízenou expozicí vzduchem za účelem zjištění citlivosti MRB vůči vzduchu (sledování fakultativních mikroorganismů).

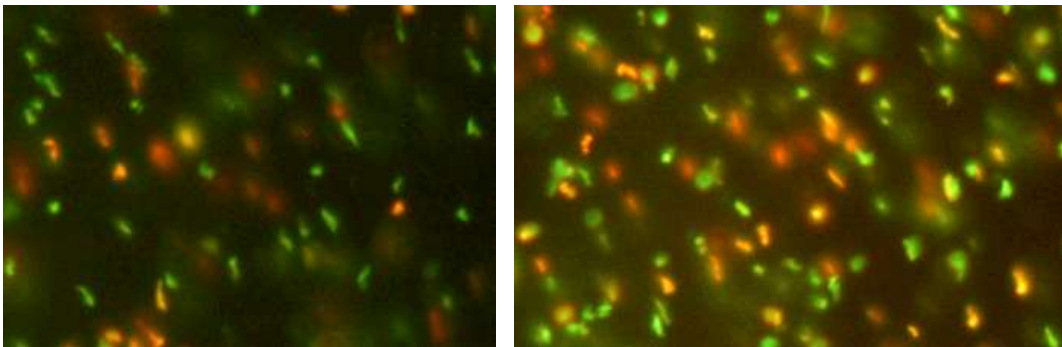
LDS v kvalitativním uspořádání: Vybrané taxony modelových mikroorganismů (*Variovorax paradoxus* a *Saccharomyces cerevisiae*) byly připraveny v podobě exponenciální fáze svého růstu, zbaveny centrifugací zbytkového média a ve formě suspenze ve fyziologickém roztoku připraveny pro mikroskopii. Mrtvá biomasa byla připravena přísadou předem zjištěné a kultivačně potvrzené toxické dávky azidu sodného.

Výsledky a diskuse

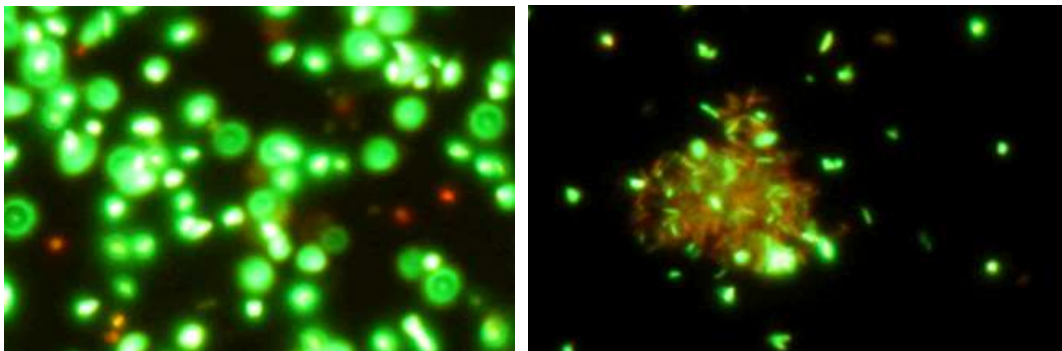
Použití výše popsané metodologie vyústilo ve vznik uceleného souboru fotografické dokumentace konkrétních simulací, v jejichž rámci byl sledován inhibiční, popř. letální efekt na studovaná konsorcia převážně anaerobních mikroorganismů. V podstatě potvrzením přítomnosti denitrifikačních a sulfátově-respirujících bakterií v horninovém prostředí kontaminovaném ropnými látkami je sekvence snímků z fluorescenční mikroskopie po použití metody LDS (obr. 1). Důkaz přežívajících mikroorganismů i po expozici vzduchem vysvětluje skutečnost, že mezi denitrifikačními mikroorganismy existuje částečně tolerance vůči aerobním podmínkám. Metoda nabízí užitečný metodický rámec zejména pro rychlou predikci podílu fakultativních a striktních anaerobů, což je z hlediska technologické praxe vítaná informace o míře citlivosti systému vůči kyslíku, popř. pro volbu vhodné biostimulační strategie koncipované na bázi dodávky zdrojů terminálních akceptorů elektronů v podobě síranů a dusičnanů. V obdobně designovaném experimentu se pozornost zaměřila rovněž na mikroorganismy zapojené do procesu mikrobiální dehalogenace. V tomto případě je klíčovou motivací zacílení na mikroorganismy striktně anaerobní v podobě nositelů schopnosti respirace chlorovaných uhlovodíků a bakterií, jejichž úloha spočívá ve fermentační produkci vodíku. Výsledky grafické dokumentace (obr. 2) lze interpretovat způsobem, který vysvětluje přítomnost bakterií po expozici systému vzduchem jejich tolerancí vůči kyslíku – buď mikroorganismy fermentující, popř. mikroorganismy nezapojené do respirační transformace. V analogickém pojetí byla metoda aplikována na bakterie manganové redukce, kde se překvapivě ukázala jejich vysoká tolerance vůči expozici vzduchem čili významný předpoklad, že jejich metabolismus ve vztahu ke kyslíku má fakultativní charakter (obr. 3).



Obr. 1: Denitrifikační a sulfátově respirující konsorcium z hlediska své viability po 7 dnech kultivace (A) a řízená expozice vzduchem (B)



Obr. 2: Konsorcium fermentačních a dehalogenačních bakterií z hlediska své viability po 5 dnech kultivace (A) a řízená expozice vzduchem (B)



Obr. 3: Konsorcium MRB po 14 dnech kultivace (A) a řízená expozice vzduchem (B)

Ukázkou jiné koncepce experimentu je úsilí ověřit schopnost vynikající biodegradační kvasinky *Yarrowia lipolytica* přežít, popř. existovat v anaerobních podmínkách. V tomto případě experiment potvrdil, že nepřítomnost kyslíku v kultivačním prostředí je neslučitelná s životními projevy testovaného mikroorganismy (obr. 4).



Obr. 4: *Yarrowia lipolytica* kultivovaná 48 hodin za anaerobních podmínek v systému s 1 g.l⁻¹ glukosy a v systému s 1 g.l⁻¹ rostlinného oleje

V rovině vývoje jednoduchého diagnostického kitu byl uskutečněn experimentem, jehož účel spočívá v možnosti využít odlišnou vizualizaci živých a mrtvých bakteriálních a kvasinkových buněk pro zjištění, zda konkrétní izolovaný kmen představuje mikroorganismus prokaryotní (bakterie) nebo eukaryotní (kvasinka). Klíčem k postupnému zdokonalování těchto postupů je informace, že živá bakteriální buňka je jasně zelená, je-li barvena technikou LDS, mrtvá bakteriální buňka červená, živá buňka kvasinek hnědá a její mrtvá forma zelená. Důležitým předpokladem pro uplatnění postupů je nalezení spolehlivé toxické látky nebo faktoru (teplota, UV záření apod.), které umožní přípravu živé i mrtvé bakteriální suspenze pro obarvení pomocí LDS a následné shromáždění informací. V tabulce I. je přehledně zpracován základní výsledkový aparát.

Tabulka I: Diagnostika křížového efektu u modelové bakteriální a kvasinkové kultury

testovaný mikroorganismus / použítá metoda a popis podmínek jejího použití	bakteriální LDS		kvasinkový LDS	
	živá	mrtvá	živá	mrtvá
bakterie (<i>Variovorax paradoxus</i>)				
kvasinka (<i>Yarrowia lipolytica</i>)				

Závěr

Praktické uplatnění výstupů studie umožňuje zdokonalit přístupy v oblasti objektivnějšího uchopení znalostí o mikroorganismech, které figurují v konsorciích kontaminovaných lokalit s omezeným přístupem kyslíku. Vedle toho se výsledky uplatňují i v rovině diagnostiky metabolického typu, popř. ve zjištění předpokladů pro vytvoření optimálních podmínek kultivačního procesu. Jednoduchost metod představuje dobrý předpoklad pro snadné zařazení do metodických rámců použitelných v těchto testech.

Poděkování

Príspevek vzniká za podpory TAČR v rámci projektu TECHTOOL s identifikačním číslem TA02020534.

Literatura:

Boulos, Lina, Michèle Prévost, Benoit Barbeau, Josée Coallier A Raymond Desjardins. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*. 1999, vol. 37, issue 1, s. 77-86.

Lafleur, M. D., C. A. Kumamoto, K. Lewis, Josée Coallier A Raymond Desjardins. *Candida albicans* Biofilms Produce Antifungal-Tolerant Persister Cells: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006-10-25, vol. 50, issue 11, s. 3839-3846.

Grígel, Juraj, Minařík, Miroslav, Turnvaldová, Kristina a Mikeš, Jiří. Metoda Live/Dead jako monitorovací metoda kvality bioaugmentace aneb využití fluorescenční mikroskopie v bioremediační praxi., 2012, Inovativní sanační technologie, Vodní zdroje Ekomonitor.

Doe, Ken, Paula Jackman, Rick Scroggins, Don Mcleay A Gary Wohlgeschaffen. Solid-Phase Test for Sediment Toxicity Using the Luminescent Bacterium, *Vibrio Fischeri*. *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, s. 107.

Beatty, Barbara, Mai, Sabine, Squire, Jeremy. *FISH: A Practical Approach*. Oxford University Press, 2002.