

Bio

Ročník 30 • Číslo 4/2020

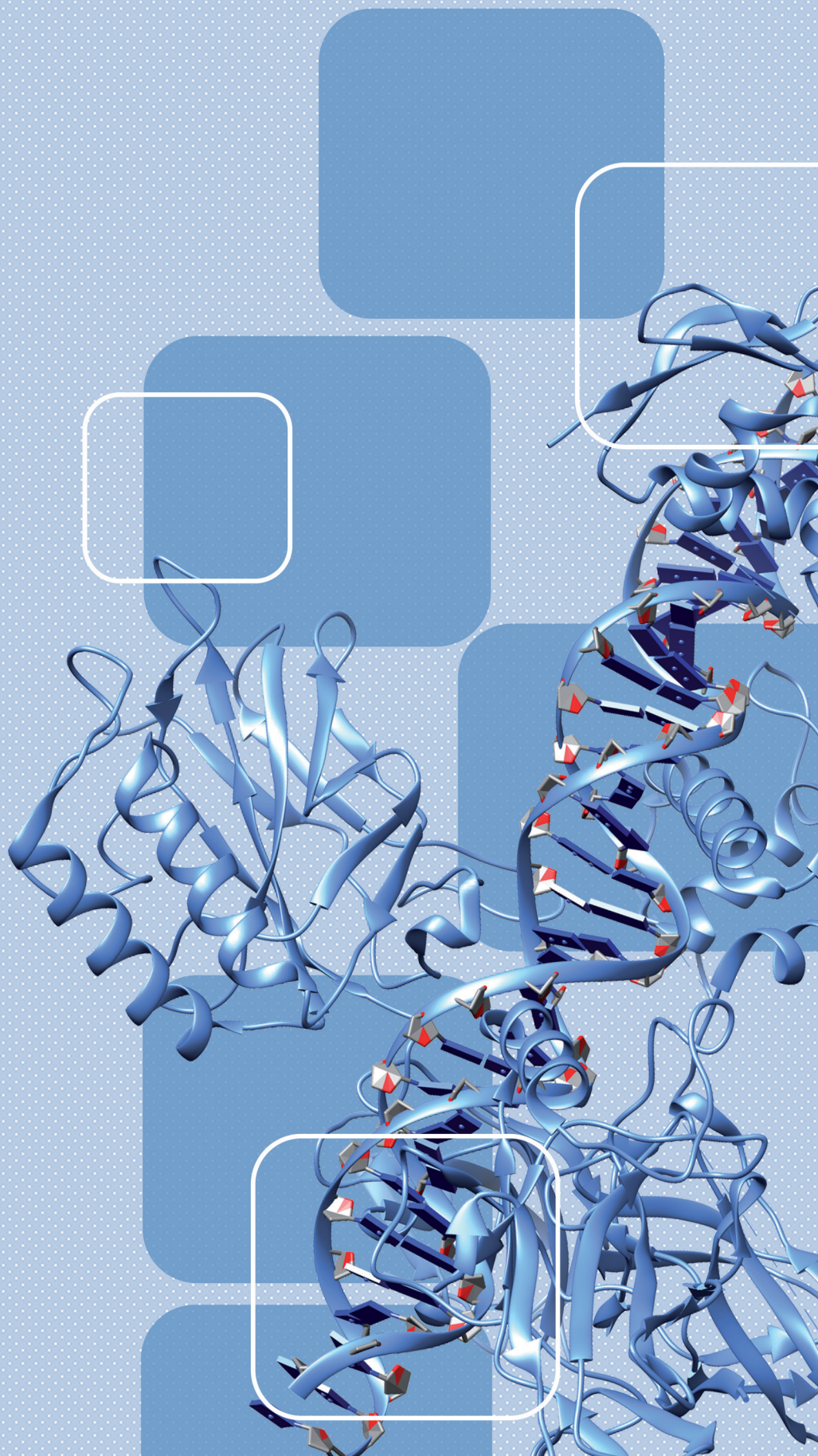
prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)

a

člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: University of Chemistry and Technology, Technická 3, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
Tel.: 420-220 443 151, fax: 420-233 334 769, e-mail: danka.pokorna@vscht.cz, IČO 00570397,
account No.: 19534-061/0100 Komerční banka Praha 6, Dejvická 52, SWIFT CODE: COMBCZTPP

Czech Republic Regional Branch Office as a bridge between European Federation of Biotechnology and Czech Biotechnology Society is located in the Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Šlechtitelů 21, 783 71 Olomouc, Czech Republic

BULLETIN OF CZECH BIOTECHNOLOGY SOCIETY

**founding member of the Czech Association of Scientific
and Technical Societies – <http://en.csvts.cz>**

**and
member of European Federation of Biotechnology
<http://www.efbiotechnology.org>**

Bioprospect, the bulletin of the Biotechnology Society is a journal intended to inform the society members about the most recent developments in this field. The bulletin should supply the vitally important knowledge directly to those who need it and to those who are able to use it properly. In accordance with the rules of the Society, the Bulletin also deals with both theoretical and practical questions of biotechnology. Articles will be published informing about the newest theoretical findings, but many planned papers are devoted to fully practical topics. In Czech Republic there is a growing gap between basic research and production. It is extremely important to reverse as soon as possible the process of further opening of the scissors, and we hope the Bulletin will help in this struggle by promoting both research and practice in our biotechnology. The Bulletin should facilitate the exchange and targeted delivery of information. The editorial board welcome advertisements of products such as chemicals, diagnostics, equipment and apparatus, which have already appeared

on the Czech market, or are projected, enter it. Services, free R&D or production facilities can also be advertised. The editorial board, together with the executive committee of the Biotechnology Society, hope that maybe some information published in the Bulletin, or some new contacts based on it, will give birth to new cooperation with domestic or foreign research teams, to collaborations, joint ventures or strategic alliances providing access to expertise and financing in international markets.

The editorial board invites all of You, who are involved in the field called biotechnology, and who are seeking contacts in Czech Republic, to advertise in the Bulletin BIOPROSPECT, which is mailed directly to more than one and a half thousand Czech biotechnologists.

For more information contacts the editorial board or directly:

Petra Lipovová, Ph.D. (editor in chief)
UCT, Technická 3
166 10 Prague 6, Czech Republic
Phone +420 220 443 028
e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

máme už zase podzim, a to je doba, kdy se dovídáme, komu bude v prosinci ve Stockholmu udělena Nobelova cena. Nás samozřejmě zajímají především ty první tři, které se Alfred Nobel rozhodl ustanovit, a to za fyziologii nebo lékařství, chemii a fyziku. K nim později přidal ceny za literaturu a mír.

Ceny jsou udělovány za výjimečné objevy, které posouvají lidské poznání o významný krok dopředu. V letošním roce naplňují oceněné výsledky vědeckého bádání tento požadavek vrchovatě a jsou snadno pochopitelné i pro běžného člověka.

Letošní Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství obdrželi Američané Harvey Alter a Charles Rice a Brit Michael Houghton za objev viru způsobujícího hepatitidu C. Dříve objevené viry hepatitidy A a B nevysvětlovaly většinu problémů spojených s onemocněním hepatitidou. Teprve objev viru hepatitidy C objasnil příčinu nevysvětlitelných případů onemocnění hepatitidou, umožnil vývoj krevních testů a vývoj nových léků. Zákeřnost žloutenky typu C spočívá v tom, že většina nemocných o své infekci neví, nemají žádné příznaky, ale může se jim vyvinout jaterní cirhóza, selhání jater či rakovina. K přenosu dochází při pohlavním styku, transfuzi, z matky na dítě při porodu, při aplikaci drog apod. Díky poznatkům získaným nobelisty byla vyvinuta antivirotika zaměřená na hepatitidu C, nemoc může být vyléčena a snad i zcela vymýcena.

Vzhledem k tomu, že na aktuálních vědeckých problémech pracuje vždy mnoho vědeckých týmů po celém světě, stalo se v posledních létech téměř pravidlem, že za určitý vědecký úspěch bývají ocenění tři vědci, což je maximální počet dle pravidel udělování cen Alfreda Nobela. Nobelovu za chemii obdržely letos však jen 2 vědkyně, a to snad také naznačuje, o jak významný objev se jedná. Emmanuelle Charpentierová a Jennifer A. Doudnaová obdržely toto významné ocenění za významný podíl na opracování techniky „genetických nůžek“ CRISPR-Cas9, která umožňuje zkoumat a upravovat genom. Studium způsobu, jímž se bakterie brání napadení viry ukázalo, že je možno „vystříhnout“ jeden konkrétní gen a přenést jej jinam, a to nejen u bakterií. Čínský profesor Lu You byl asi první, kterému

se podařilo geneticky upravit lidské buňky a vnést je do těla člověka trpícího rakovinou. Následovaly úspěšné pokusy o opravu vadného genu v lidském embryu, příprava upraveného genomu kvasinek atd. Před námi je perspektiva úspěšného léčení řady dědičných chorob způsobených jediným „překlepem“ v genetickém kódu (cystická fibróza, vrozená slepota aj.), který stačí jen „vymazat“ nebo „vyměnit“. Uvedený objev nastartoval celou řadu dalších vylepšených technik, včetně úpravy RNA či výměny jednotlivých bazí. Genové technologie se však prudce rozvíjejí nejen v oblasti farmaceutického průmyslu a medicíny, ale mají velké perspektivy i v zemědělství a v nejrůznějších průmyslových oblastech, včetně potravinářských technologií. Technologie CRISPR-Cas 9 má mezi dalšími vyvinutými genovými technologiemi jako jsou např. TALEN (transcription activator-like effector nuclease system), ZFN (zinc finger nucleases) aj. dominantní postavení, protože je jednodušší, více flexibilní a přesnější, a tudíž i méně finančně nákladná.

Fantastické objevy v moderní chemii, resp. biochemii a ve fyziologii a lékařství jsou doprovázeny i dech beroucími objevy ve fyzice. Již první Nobelova cena za fyziku v r. 1901 byla udělena za objev záření pojmenované po svém objeviteli Wilhemu Conradu Röntgenovi. Příští rok to bude 120 let, co lidstvo toto záření využívá v nejrůznějších oborech lidských činností od mnoha medicínských oborů po bezpečet průmyslových aplikací. V letošním roce byla Nobelova cena udělena za dva významné objevy třem vědcům. První polovinu (i z hlediska finančního) získal britský fyzik Roger Penrose za objev, že formování černé díry je predikcí obecné teorie relativity. Potvrdil Einsteinovu teorii relativity, která potvrzuje vznik černých děr. Reinhard Genzel a Andrea Ghezová ukázali, že neviditelné a extrémně těžké předměty ovlivňují oběžné dráhy hvězd v prostoru Mléčné dráhy, což je způsobeno přítomností supermasivní „černé díry“.

Tyto významné úspěchy vědy trochu blednou v době, kdy nás přepadla druhá vlna coronavirové pandemie. Doufejme, že vědecké úsilí i v této oblasti bude úspěšné a v blízké době budeme mít efektivní vakcíny, které umožní dostatečným proočkováním odrazit i případnou další vlnu pandemie. Těšíme se, že útok covidu-19 zeslábně a co nejrychleji odezní. Přejeme Vám všem, abyste zůstali zdraví a prožili v pohodě vánoční svátky a v novém roce 2021 jsme začali žít způsobem, na který jsme zvyklí. Pevně věříme, že také budeme moci připravit naši odloženou biotechnologickou konferenci BIOTECH 2020 ve standardním formátu a setkáme se zde se všemi našimi přáteli z domova i zahraničí.

S pozdravy a přáním splnění
všeho po čem toužíte
Vaši
Jan Káš a Petra Lipovová



INDUKOVANÁ PLURIPOTENCIA V *IN VITRO* MODELOVANÍ CHORÔB A V REGENERATÍVNEJ MEDICÍNE

Ján Strnadel¹, Romana Záhumenská¹, Dominika Hajdúchová², Vladimír Nosál³, Marek Smolár⁴, Michal Kalman⁵, Juraj Marcinek⁵, Štefan Juhás⁶, Jana Juhášová⁶, Barbora Mitrušková⁷, Hana Studenovská⁸, Dušan Braný¹, Sandra Meršáková¹, Slavomíra Nováková¹, Henrieta Škovierová¹, Renata Péčová², Egon Kurča³, Erika Halašová¹

¹Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin), Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ²Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ³Neurologická klinika, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave a Univerzitná nemocnica Martin, Slovenská republika, ⁴Chirurgická klinika a transplantáčnej centrum, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ⁵Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovenská republika, ⁶Ústav živočíšnej fyziológie a genetiky AV ČR, v.v.i, Liběchov, Česká republika, ⁷Oddelenie lekárskej genetiky, Univerzitná nemocnica Martin, Slovenská republika, ⁸Ústav makromolekulárnej chémie AV ČR, Praha, Česká republika; jan.strnadel@uniba.sk>

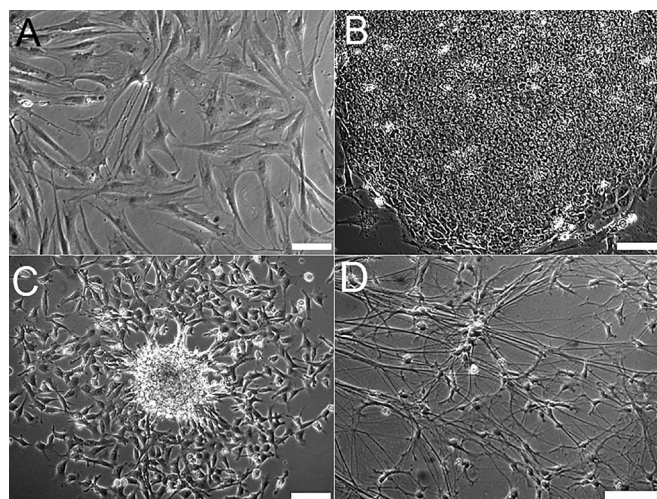
Úvod

V roku 2006 sa v laboratóriu mladého japonského lekára Shinyu Yamanaku po sérii transdukčných experimentov (virálneho prenosu skupiny génov, kódujúcich vopred selektované transkripčné faktory) v bunkovej kultúre myšacích fibroblastov objavili malé kolónie, ktoré nápadne pripomínali kolónie embryonálnych kmeňových buniek¹. Tento experiment bol prvým dôkazom, že terminálne diferencovanú somatickú bunku je možné reprogramovať do formy pluripotentnej kmeňovej bunky (Obr. 1) pomocou iba štyroch transkripčných faktorov (Oct4, Sox2, Klf4 a c-Myc), ktoré sú dnes známe pod názvom Yamanakove faktory. Objav tzv. indukovaných pluripotentných buniek (iPSc) následne spôsobil doslova revolúciu v oblasti regeneratívnej medicíny a v *in vitro* modelovaní chorôb^{2,3,4,5}. Už šesť rokov po objave bola doktorovi Yamanakovi (spolu s britským

biológom Johnom B. Gurdonom) udelená Nobelova cena⁶.

Indukované pluripotentné kmeňové bunky

Aj keď sa na samotný objav indukovanej pluripotencie dá pozeráť ako na logický výsledok viac ako šesťdesiatročnej syntézy vedeckých poznatkov a rozvoja technológií v oblasti regeneratívnej medicíny⁷, fascinujúca možnosť reprogramovať akúkoľvek terminálne diferencovanú (dospelú) bunku do štádia kmeňovej bunky pomocou exprese iba niekoľkých transkripčných faktorov zmenila spôsob, akým uvažujeme o návrhu terapií „šitých na mieru“ pre pacientov v budúcnosti. Na rozdiel od embryonálnych kmeňových buniek (ESC), ako aj buniek odvodených z fetálneho tkaniva, použitím týchto buniek nevzniká etický problém. Pri izolácii embryonálnych kmeňových buniek totiž nevyhnutne dochádza k deštrukcii ľudského zárodka. Eticky (aspoň v teoretickej rovine) prijateľnejšie biopsie embrya v skorých štádiách, ktoré viedli k izolácii potrebného množstva embryonálnych buniek a súčasne nevedli k zničeniu zárodka nie sú prakticky použiteľné kvôli extrémnej technickej náročnosti a finančne náročnému technickému vybaveniu⁸. Okrem toho, terapie založené na využití ESC predstavujú tzv. aloterapie, pri použití ktorých by bola nevyhnutná imunosupresívna liečba. Tá je pre pacientov jednak veľmi zaťažujúca (je spojená s nežiaducimi účinkami a vyšším výskytom rakoviny u imunosuprimovaných pacientov), zároveň je spojená s veľkými finančnými nákladmi pre zdravotné poisťovne a nezriedka aj pre samotných pacientov. Terapie založené na použití buniek derivovaných z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (iPSc) však môžu tento fakt zmeniť vďaka tomu, že umožňujú prípravu potrebných autológnych terapeutických buniek v prakticky neobmedzenom množstve a to priamo z buniek pacienta, čím odpadá nutnosť použitia agresívnej imunosupresie ako je tomu v prípade použitia buniek z iných zdrojov⁹ (Obr. 2). Prvé *in vivo* štúdie s iPS bunkami však paradoxne ukázali opak a poukázali na fakt, že aj niektoré autológne iPS bunky môžu byť imunogénne pre pacienta a preto by boli nevhodné pre terapiu bez použitia imunosupresívnych látok¹⁰. Je príčinou tzv. epigenetická pamäť iPSc bu-



Obr. 1 Ľudské primárne dermálne fibroblasty (A), transdukované lentivirálnym vektorom (kódujúcim gény pre Oct4, Sox2, Klf4, a c-Myc) a reprogramované na indukované pluripotentné kmeňové bunky (B). Evidentná je zmena fenotypu a celkovej morfológie buniek v kolónii indukovaných kmeňových buniek (B). Embryoidné telieska (kolónie iPSc buniek rastúce v 3D podmienkach vo forme sféroidov) prenesené na platničky pokryté laminínom, obkolesené vyrastajúcimi neurálnymi prekursorami (C). Neurálne prekursor, kultivované v diferenciačnom médiu a diferencované do neurónov (D). Zdroj: vlastné experimenty, mierka predstavuje 10 µm.

niek a z toho vyplývajúca imunogenicitá? Alebo záleží na metóde reprogramovania, pri ktorej môže dôjsť k zvýšenej expresii niektorých imunogénnych faktorov? Tzv. epigenetická pamäť, pri ktorej dochádza k zachovaniu niektorých pôvodných epigenetických znakov reprogramovanej bunky i v jej následnom pluripotentnom štádiu bola experimentálne potvrdená. Pôvodne bola niektorými autormi považovaná za prekážku pre zavedenie iPSc buniek do terapeutického použitia, čo sa však nestalo. Závažnejším problémom sa ukázala byť metóda reprogramovania buniek do štádia pluripotencie – najmä použitie virálnych vektorov, spojené so zabudovaním Yamanakových faktorov do génomu bunky. Toto nezriedka viedlo k mutáciám a dokonca k malígnej transformácii reprogramovaných buniek. Pôvodný protokol reprogramovania buniek, použitý Dr. Yamanakom využíval retrovirálne vektory (retrovírusy), ktoré kodovali gény pre štyri transkripčné faktory (Oct4, Sox2, Klf4, a c-Myc)¹. Retrovirálne, prípadne lentivirálne vektory (vírusy) sa však nedajú použiť na prípravu terapeuticky aplikovateľných kmeňových buniek, pretože sú schopné spôsobovať mutácie a dokonca vznik nádorov^{11,12}. S týmto súvisí aj hlavný problém, spojený s dostupnými iPSc bunkami, ktoré boli pripravené práve pomocou spomínaných vektorov (dôvodom bola vysoká efektivita reprogramovania v prípade použitia vírusov ako vektorov). Selekcia pomocou antibiotík, prípadne efektívnejšie sortovacie metódy buniek nemôžu tento problém komplexne vyriešiť. Kvôli tomuto faktoru je potrebná príprava bezpečnejších iPSc línií, vyrobených neintegračnými (footprint-free) metódami a ich dôsledné testovanie pred aplikáciou. Neintegračné spôsoby reprogramovania možno rozdeliť do dvoch skupín: i) metódy založené na použití tzv. neintegrujúcich virálnych vektorov a ii) nevirálne metódy. Medzi tzv. neintegrujúce vírusy patria adenovírusy a Sendai vírus, nevirálne metódy sú reprezentované mRNA a miRNA molekulami, PiggyBac transpozónmi, minivektormi a epizomálnymi plazmidmi¹³.

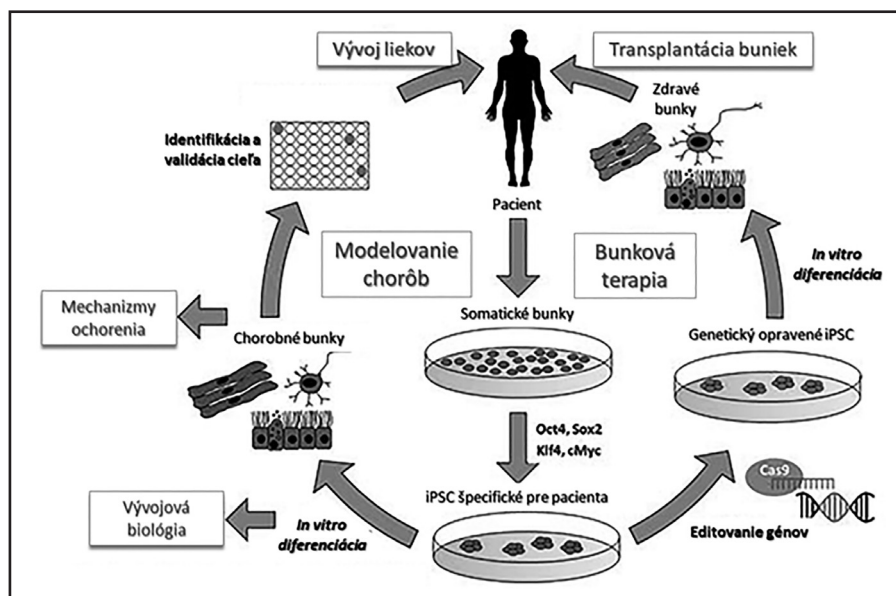
Vývoj tzv. footprint-free technológií v procese prípravy iPSc buniek zahŕňal použitie „bezpečných“ neinkorporujúcich vírusov (napr. Sendai vírusov), plazmidov, polycystrónovej syntetickej RNA, koktailu reprogramovacích faktorov vo forme proteínov a pod. Štúdie z posledných rokov ukazujú, že použitím vhodných neintegračných metód reprogramovania spolu s kultivačnými podmienkami bez použitia animálnych produktov (tzv. „xeno-free“), je príprava vlastných neimunogénnych kmeňových buniek s požadovanými vlastnosťami reálna. Napriek týmto optimistickým výsledkom, množstvu *in vitro* a *in vivo* štúdií a niekoľkým prebiehajúcim klinickým štúdiám, iPSc bunky ešte stále nie sú pripravené na priame použitie v bunkových terapiách. Hlavným dôvodom je neistota, ktorá sa týka bezpečnosti týchto buniek. iPSc bunky (rovnako ako embryonálne kmeňové bunky) majú totiž tendenciu tvoriť tzv. teratómy (nezhubné nádory, odvodené z pluripotentných zárodočných buniek). Dôvodom sú použité spôsoby reprogramovania a nedokonalé pro-

tokoly diferencovania transplantovaných kmeňových buniek. Jedna z prvých klinických štúdií¹⁵ bola na doporučenie samotného Dr. Yamanaku prerušená hneď potom, ako boli identifikované malé mutačné zmeny v terapeutických bunkách. Prerušenie klinickej štúdie nie je nevyhnutné hneď interpretovať ako zlyhanie, skôr ako dôsledok vysoko profesionálneho prístupu tvorcov terapie ku vzniknutej situácii. V súčasnej dobe prebiehajú klinické štúdie, ktoré majú potenciál premietnuť sa veľmi reálne do terapeutického praxe.

Príprava autológnej línie na terapeutické účely pre každého konkrétného pacienta je z hľadiska časového a aj finančného určitou nevýhodou. Napriek tomu, že sa v poslednom období podarilo skrátiť protokoly prípravy rôznych typov iPSc-derivovaných buniek na obdobie niekoľkých týždňov resp. dní, finančná a aj technická náročnosť prípravy takýchto terapeutických buniek ostáva stále vysoká. V budúcnosti sa preto predpokladá využitie imunologicky kompatibilných a vopred pripravených buniek, uložených v biobankách. Na ilustráciu – pre potreby 90 % populácie obyvateľov Japonska by podľa predpokladov malo stačiť okolo 140 línií iPSc buniek¹⁴. Pri samotnej aplikácii terapeutických buniek sa budú prevažne využívať prekurzorové, čiastočne diferencované, iPSc-derivované bunky a len vo výnimočných prípadoch bunky finálne diferencované. *In vivo* experimenty totiž ukázali, že finálne diferencovaná bunka prežíva samotný proces transplantácie oveľa horšie, ako mitoticky dočasne aktívny prekurzor¹⁵.

iPSc technológia v *in vitro* modelovaní chorôb

Obrovským prínosom novej technológie spojenej so zmenou terminálne diferencovanej bunky na pluripotentnú bunku je možnosť *in vitro* modelovania rôznych druhov ochorení (Obr. 2). V praxi to znamená, že iPSc technológia doslova odhalila nové horizonty v oblasti modelovania chorôb. Indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSc) špecifické pre dané ochorenie predstavujú unikátny nástroj pre štúdium vývoja patologického stavu *in vitro*⁴. Ťažko získateľné bunky z tela pacienta (napr. postihnuté neuróny) môžu byť efektívne pripravené v *in vitro* podmienkach z ľahko



Obr. 2 Schéma využitia technológie indukovaných pluripotentných kmeňových buniek v *in vitro* modelovaní chorôb a regeneratívnej medicíne. Upravené podľa citácií

dostupného tkaniva napr. kože alebo dokonca krvných buniek a následne využité na testovanie nových liečebných postupov⁴. Táto stratégia nahrádza bolestivé (a nie vždy realizovateľné) zákroky ako biopsie a odber tkaniva z mozgu, miechy a iných orgánov. V poslednom období bolo za účelom testovania efektívnych molekúl vyvinutých niekoľko *in vitro* bunkových modelov pre rôzne neurodegeneratívne ochorenia. Vďaka cielej diferenciacii indukovaných pluripotentných kmeňových buniek do motorických neurónov sa napríklad podarilo vyvinúť nové bunkové modely amyotrofickej laterálnej sklerózy (ALS)⁴.

Členovia výskumného tímu laboratória **Cellphie (Cell phenotyping, imaging and engineering lab)** v Martinskom centre pre biomedicínu Jesseniovej lekárskej fakulty v Martine, UK v Bratislave zaviedli metódu indukovanej pluripotencie ako jedno z prvých pracovísk na Slovensku. Úspešne izolovali niekoľko klonov iPSc línií od pacienta s amyotrofickou laterálnou sklerózou⁴. *In vivo* charakterizáciu prekursorových buniek spojenú s transplantáciou iPSc-derivovaných neurálnych prekursorov do miechy imunosuprimovaného prasata realizujú v spolupráci s českým Ústavom živočíšnej fyziológie a genetiky AV ČR v Liběchově a Ústavom makromolekulovej chémie v Prahe. V súčasnej dobe pripravujú aj *in vitro* modely izolované metódou indukovanej pluripotencie z pacientov s Duschennovou svalovou dystrofiou.

Záver

Objav metódy indukovanej pluripotencie ponúka dnešnému vedeckému svetu nové možnosti v príprave unikátnych *in vitro* modelov a terapeutických prístupov, založených na princípoch terapie „šitej na mieru“. Poznatky získané štúdiom reprogramovania buniek sú zároveň použiteľné aj v oblasti výskumu

nádorov. iPSc technológia je už využívaná aj vo výskume nového koronavírusu SARS-CoV-2, ktorý spôsobil pandémiu COVID-19. Napríklad v štúdiu uverejnenej v časopise *Cell Reports Medicine* autori študovali mechanizmus infekcie iPSc-derivovaných kardiomyocytov novým koronavírusom¹⁶ (virálna myokarditída je totiž častou sprievodnou komplikáciou infekcie koronavírusom SARS-CoV-2). Autori štúdie zistili mechanizmus infekcie kardiomyocytov a patologický efekt vírusu na aktivitu svalových buniek v *in vitro* podmienkach. Ďalším príkladom využitia iPSc technológie v boji s novým koronavírusom bola štúdia uverejnená v *Inflammation and Regeneration*, v ktorej autori študovali vplyv infekcie na bunky centrálného nervového systému¹⁷. iPSc-derivované neurálne prekursorové exprimujúce ACE-2 receptorový enzým pre koronavírus a zároveň aj CCN1 (proteín indukovaný infekciou) sa takto môžu stať veľmi významným *in vitro* modelom v tejto oblasti výskumu. Bez nadsázky je možné predpokladať, že iPSc technológia bude pravdepodobne kľúčom k novým fascinujúcim objavom už v blízkej budúcnosti.

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: „Centrum excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET) „ITMS kód projektu: 26220120053, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja“ a grantov Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA 1/0279/18) a Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-17-0037). Projekt podporil aj Národný program udržateľnosti I, projekt číslo LO1609 (Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy) a projekt Institucionální podpory RVO: 67985904.

Referencie

1. Takahashi K, Yamanaka S: *Cell*. 126(4), 663-676 (2006).
2. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, et al.: *Nature*. 482(7384), 216-220 (2012).
3. Marchetto MC, Carromeu C, Acab A et al.: *Cell*. 143(4), 527-539 (2010).
4. Strnadel J, Zahumenska R, Nosal V, et al.: *Stem Cell Res*. 48, 101981 (2020).
5. Scudellari M: *Nature*. 534(7607), 310-312 (2016).
6. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/summary/>, stiahnuté 4. októbra 2020.
7. Stadtfeld M, Hochedlinger K: *Genes Dev*. 24(20), 2239-2263 (2010).
8. Dittrich R, Beckmann MW, Würfel W: *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 75(12), 1239-1242 (2015).
9. Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, et al.: *Cell Stem Cell*. 12(4), 407-412 (2013). Erratum in: *Cell Stem Cell*. 21(1), 144-148 (2017).
10. Zhao T, Zhang Z, Rong Z. et al.: *Nature*. 474, 212-215 (2011).
11. Liu Z, Tang Y, Lü S, et al.: *J Cell Mol Med*. 17(6), 782-791 (2013).
12. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, et al.: *Cell*. 156(4), 663-677 (2014).
13. Malik N, Rao MS: *Methods Mol Biol*. 997, 23-33 (2013).
14. Umekage M, Sato Y, Takasu N: *Inflamm Regen*. 39, 17 (2019).
15. Strnadel J, Carromeu C, Bardy C, et al.: *Sci Transl Med*. 10(440), eaam6651 (2018).
16. Sharma A, Garcia G, Arumugaswami V, et al.: *Cell Rep Med*. 1(4), 100052 (2020).
17. Kase Y, Okano H: *Inflamm Regener*. 40, 32 (2020).

Souhrn

**Strnadel J., Zahumenská R., Hajdúchová D., Nosál V., Smolár M., Kalman M., Marcinek J., Juhás Š., Juhásová J., Mitrušková B., Studenovská H., Braný D., Meršáková S., Nováková S., Škovierová H., Péčová R., Kurča E., Halašová E.: Indukovaná pluripoten-
cia v *in vitro* modelovaní chorôb a v regeneratívnej medicíne**

Objev indukovaných pluripotentních kmenových buněk profesorem Shinya Yamanakem, který byl v roce 2012 oceněn Nobelovou cenou, otevřel nové horizonty v oblasti regenerativní medicíny, *in vitro* modelování nemocí nebo screeningu léčiv. Unikátní technologie, která umožňuje přípravu eticky přijatelných autologních kmenových buněk, činí reálnou oblast personalizované medicíny. Technologie iPSCs našla využití rovněž při *in vitro* modelování, kde umožnila přípravu buněk těžko dostupných tkání, např. neuronů nebo kardiocytů, z poměrně lehce dostupného zdroje, kterým jsou např. dermální fibroblasty. Takto připravené *in vitro* biomedicínské modely jsou aplikovatelné v preklinických studiích resp. při testování léčiv. Technologie iPSCs má široký potenciál využití v různých medicínských oblastech a rovněž již našla upotřebení také v boji proti nové pandemii koronaviru.

Klíčové slova: indukované pluripotentní kmenové buňky, kmenové buňky, personalizovaná terapie, *in vitro* modely nemocí

Summary

Strnádel J., Záhumenská R., Hajdúchová D., Nosál V., Smolár M., Kalman M., Marcinek J., Juhás Š., Juhásová J., Mitrušková B., Studenovská H., Braný D., Meršáková S., Nováková S., Škovierová H., Péčová R., Kurča E., Halašová E.: Induced pluripotency for *in vitro* disease modeling and regenerative medicine

Discovery of induced pluripotent stem cells by Dr. Shinya Yamanaka, awarded by Nobel Prize in 2012 opened new horizons in the field of regenerative medicine, *in vitro* disease modeling and drug screening. A unique technology that allows preparation of ethical issues-free, autologous therapeutic stem cells is revolutionizing the field of patient-tailored therapies. For *in vitro* modeling, iPSC technology represents a unique possibility for preparation of hard-to-get cells (neurons, cardiomyocytes etc) from patient skin fibroblasts for further studies and drug testing. iPSC technology has potential and is already used in world research effort in fight against new coronavirus pandemic.

Keywords: induced pluripotent cells, stem cells, personalised therapy, *in vitro* disease models

PROBLEMATIKA VYUŽITÍ PROBIOTIK U PSŮ

Jan Kolek, Petra Patáková

Ústav biotechnologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze; petra.patakova@vscht.cz

Úvod

Probiotické a symbiotické organismy jsou využívány člověkem, ať už vědomě, či zcela nevědomě, již po dobu několika tisíc let. Mezi první používaná probiotika se řadí především bakterie mléčného kysání a kvasinky. Termín „probiotikum“, který má základ v řečtině a lze jej přeložit jako „pro-život“, použili poprvé Lilly a Stillwell v roce 1965¹. Recentní, všeobecně přijímaná definice od roku 1989 popsala probiotika, jako „živé mikroorganismy v potravě, které mají pozitivní vliv na hostitele a vylepšují jeho střevní mikrobiální rovnováhu“². Ze stejné definice vychází i světová Organizace pro výživu a zemědělství a Světová zdravotnická organizace (FAO/WHO), která definici pouze upravila na „živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány ve vhodných dávkách, přinášejí svému hostiteli zdravotní benefit“.

Definice a bezpečnost použití probiotik

Vlastnosti dobré probiotické kultury, jak je definoval Fuller v roce 1989², jsou následující:

- Obsah životaschopných buněk, ideálně ve vysokém množství
- Příznivý vliv na podporu růstu zdraví prospěšných mikroorganismů
- Stabilita při skladování
- Organismy nejsou patogenní ani toxigenní; jejich použití nemá žádné jiné nežádoucí účinky
- Organismy jsou odolné vůči nízkému pH a ostatním podmínkám trávicího traktu hostitele

Při použití probiotik jsou v současnosti posuzovány především dvě hlavní možná rizika. Prvním je možnost vyvolání onemocnění, ač například jen u imuno-kompromitovaných kusů zvířat. Kromě bezpečnosti pro samotného hostitele, je třeba vždy zvážit i rizika, která nejsou často patrná na první pohled. Jedná se např. o bezpečnost pro dělníky při výrobě a zpracování (popř. zavedení vhodných bezpečnostních opatření), bezpečnost při přepravě a případném úniku při haváriích, bezpečnost pracovníků podávajících probiotika zvířatům a pohybujících se v prostoru, kde se probiotika používají, bezpečnost dalších zvířat (a potenciálně i jiných organismů), které přicházejí s hostitelem do styku, bezpečnost pro mladé, zraněné nebo imunitně znevýhodněné kusy atd.

Psí zažívací trakt

Složení mikroflóry zažívacího traktu psa

U psa, stejně jako u jiných organismů s trávicí trubici diferencovanou do více specializovaných celků, stoupá počet a diverzita přítomných mikroorganismů s postupem trávicí soustavy^{3,4}. V žaludku psa je díky silně kyselému prostředí, které má na většinu mikroorganismů přijímaných z potravy letální efekt, poměrně malá koncentrace mikroorganismů a stejně tak je velice nízká i jejich diverzita. Ze všech přítomných mikroorganismů tvoří asi 99,5 % bakterie spadající do kmene *Proteobacteria*. Kmen *Firmicutes*, kam spadají bacili a klostridia, tvoří jen asi 0,3 % žaludečního mikrobiomu psa. Z hlediska druhů je nejpočetněji zastoupen především druh *Helicobacter* a *Lactobacillus*⁵.

Mikrobiom dvanáctníku se již od zastoupení mikroorganismů v žaludku zásadně liší. Jednak se zde vyskytuje mnohem větší koncentrace mikroorganismů a stejně tak fundamentálně stoupá i jejich diverzita. Stejně jako v případě přechodu do dvanáctníku, se mikrobiom střeva zásadně mění i s přechodem do lačnicku. Zde je opět nejvyšší počet proteobakterií (cca 46 %), *Firmicutes* však zaujímají již asi 15 %. *Actinobacteria* zaujímají asi 11,2 % celkové flóry lačnicku, *Spirochaetes* asi 14 %, *Bacteroidetes* 6,2 % a *Fusobacteria* 5,4 % (Suchodolski *et al.*, 2009). Z hlediska jednotlivých druhů je jak v dvanáctníku, tak i lačnicku nejvíce zastoupen druh *Lactobacillus*, který tvoří asi 22 % celkové mikroflóry dvanáctníku a 10 % lačnicku⁶.

V tlustém střevě psa přetrvává poměrně vysoká koncentrace bakterií řádu *Clostridiales*. Zde tvoří 18 % z celkového počtu mikroorganismů⁷. Zbytek mikroflóry tlustého střeva je rozdělen vcelku vyrovnaně mezi taxony *Fusobacteria* a *Bacteroidetes*. Na rozdíl od předchozího oddílu, kyčelníku, jsou v tlustém střevě opět o poznání více zastoupeny laktobacily, které zde tvoří až 10 % mikroflóry. Proteobakterie, včetně koliformních bakterií, tvoří u zdravého psa jen asi 1,4 % mikrobiomu tlustého střeva⁸.

Fekální mikrobiom psa obsahuje zpravidla bakterie spadající do skupiny *Fusobacteria* (24 – 40 %), *Bacteroidetes* (32 – 34 %), *Firmicutes* (15 – 28 %), *Proteobacteria* (5 – 6 %) a *Actinobacteria* (0,8 – 1,4 %) ^{6,8,9}.

Obecným problémem zkoumání mikrobiomu psího zažívacího traktu je na rozdíl např. od výzkumu složení střevní flóry některých hospodářských zvířat¹⁰, nedostatek kvalitních, recentních dat a publikovaných prací. Některé starší práce, které jsou založeny na kultivačních technikách, nejsou v žádném ohledu porovnatelné s pracemi založenými na identifikaci a kvantifikaci pomocí metod molekulární biologie. Dalšími problémy v lepší orientaci v této problematice je fakt, že takřka veškeré experimenty mající za cíl popsat mikrobiom psa, byly prováděny vždy výhradně na zdravých zvířatech a nemáme tedy příliš mnoho informací o proměnách mikrobiomu u nemocných zvířat, popř. přímých souvislostech mezi změnami ve složení mikroorganismů a propuknutí určité nemoci.

Změny mikrobiomu zažívacího traktu psa při patologických stavech

Kolonizace střevní stěny patogenem typicky narušuje integritu střevní epitelální bariéry, ať už přítomností samotného patogenu a následnou imunitní odpovědí, nebo např. produkcí toxinů, porinů atd.¹¹ Mezi nejrozšířenější patogeny psů, které napadají trávicí trakt, patří především *C. perfringens*, *Salmonella* spp. a *E. coli*¹². Na druhou stranu, některé kmeny těchto druhů byly popsány v mikrobiomu zažívacího traktu psa jako komenzální organismy. Některé z nich jsou patrně dokonce důležitou složkou mikroflóry a jejich výskyt ve střevě je pro hostitele dokonce přínosný, jako je tomu u různých netoxinogenních kmenů *C. perfringens*, ale hlavně bakterie *E. coli*¹³. Nelze tedy jednoznačně spojit prostý průkaz patogenu ve fekálním vzorku s nemocí pozorovanou u zvířete. Minimálně, je vždy potřeba kromě kultivačního průkazu připojit ještě kvantifikaci daného mikroorganismu. V ideálním případě by bylo potřeba stanovit přesně taxonomicky daný izolovaný kmen a potvrdit nebo vyvrátit jeho schopnost tvorby toxinů. Existují tedy sice studie, které se snažily najít typický obraz fekálního mikrobiomu přímo souvisejícího např. s průměrem u psů¹⁴, obecný nástroj vedoucí k rychlé a přesné identifikaci problémů ukazujících na určitou disbalanci ve střevní mikroflóře se prozatím nikomu nepodařilo.

Podařilo se nicméně identifikovat alespoň některé základní, opakující se trendy v mikrobiálním složení fekálního vzorku, které provázejí stejné pozorované patologické příznaky zvířete u velkého počtu případů. Např. u akutního průjmu, je zpravidla zaznamenán především zvýšený výskyt bakterií rodu *Clostridium* (konkrétně především již zmíněného *C. perfringens*), dále je zpravidla ve vzorku zvýšené zastoupení bakterií, jako je *E. coli*, *Lactobacillus* spp. a *Enterococcus* spp. S nárůstem počtu těchto bakterií je zároveň zpravidla snížený počet jiných bakteriálních druhů, které za fyziologických podmínek ve fekálním vzorku převažují, jako je např. *Ruminococcus*, *Faecalibacterium* atp.^{15,16,17}

Podrobněji byly zkoumány změny fekální mikroflóry také např. u psů trpících Crohnovou chorobou. Bylo zjištěno, že u psů trpících touto nemocí probíhají velice podobné změny střevní a fekální mikroflóry, jako u stejně postižených lidí⁶. Typickým obrazem Crohno-

vy choroby je značně vyšší zastoupení proteobakterií v oblasti dvanáctníku na úkor ostatních druhů, které se zde fyziologicky vyskytují. U psa se konkrétně jedná v největší míře o bakterie rodu *Clostridium*, popř. další druhy spadající do skupiny *Clostridiales*¹⁸. Ve fekálním vzorku je potom pozorována taktéž snížená diverzita, přičemž lze ve vzorcích klasicky nalézt opět největší podíl proteobakterií, konkrétně se jedná hlavně o gamma-proteobakterie, hlavně *E. coli*¹⁹.

Dosavadní zkušenosti s psími probiotiky

Probiotika s odborným posouzením v EU

Od spuštění modelu QPS (qualified presumption of safety), což je aktuální závazný a obecně přijímaný postup pro schvalování probiotických kultur pro zvířata v EU z roku 2003, vydal úřad EFSA své vědecké stanovisko k několika bakteriálním kmenům/produktům, které měly sloužit výhradně, jako probiotika pro psy. Ve dvou případech se jednalo o kmeny bakterie *Enterococcus faecium* (NCIMB 10415 E1705 a NCIMB 10415 E1707)^{20,21,22}. Dále byl posuzován např. kmen *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 25²³, *L. reuteri* NBF-1²⁴, *L. fermentum* NCIMB 4136, *L. plantarum* NCIMB 41638, *L. rhamnosus* NCIMB 41640²⁵ či *Bifidobacterium* sp. *animalis* bez bližšího určení daného kmenu²⁶. V jednom případě se jednalo také o sporotvornou bakterii, a sice *B. subtilis* DSM 15544²⁷.

Oba kmeny enterokoků, byly již v předchozím řízení schváleny pro použití na hospodářských zvířatech, nebyl tedy předpoklad, že by jeho použití nebylo povoleno i pro malá zvířata. To i přesto, že *E. faecium* není na seznamu QPS shrnující kmeny bakterií, které jsou považovány obecně za bezpečné pro použití v podobných preparátech (tzv. „QPS-status“). Sem není zařazen především pro velkou možnost přítomnosti transferovatelných antibiotických rezistencí, které jsou pro enterokoky velmi typické. Pro preparát obsahující kmen *E. faecium* NCIMB 10415 E1707 bylo rozhodnuto, že bylo dodáno dostatek informací k platnému rozhodnutí úřadu EFSA, a že je použití preparátu obsahujícího tento kmen enterokoka bezpečné pro malá zvířata i pro lidi, kteří přijdou při použití s preparátem do styku nebo ho budou prodávat. U druhého kmenu *E. faecium* NCIMB 10415 E1705 bylo rozhodnuto, že je velice nepravděpodobné, že by způsobil jakékoliv ohrožení a to i při několikanásobném překročení doporučených dávek. U obou kmenů enterokoka bylo také stanoveno, že žádným způsobem nepodporují růst hemolytických i nehemolytických kmenů *E. coli* ve psech, potenciálně ani v kočkách či dalších malých zvířatech. Díky těmto závěrům byla většina preparátů obsahujících *E. faecium* v následném procesu povolena pro použití na malých zvířatech bez dalších podrobných testů a *E. faecium* je v současnosti patrně nejpoužívanější složkou probiotik pro malá zvířata na evropském trhu.

Jako bezpečné bylo podobně také označeno např. použití mixu tří kultur laktobacilů²⁵, u kterých nebyla nalezena žádná antibiotická rezistence a všechny tři kmeny byly dostatečně a bezpečně identifikovány, což společně s uděleným QPS statutem bylo považováno za dostatečný důkaz bezpečnosti používání těch-

to kultur. U kmene *L. acidophilus* DSM 13241 25 také nebyla úřadem EFSA zpochybněna bezpečnost použití na psech a dalších zvířatech²³. Kmen byl citlivý na všechna běžně používaná antibiotika s výjimkou ciprofloxacinu, přičemž byla ale objasněna podstata této rezistence na molekulární úrovni a byla označena za nepřenosnou, jelikož se jedná o souhrn více bodových mutací v genomové DNA. K tomuto kmenu nebyla však dodána žádná data o vlivu na známé střevní patogeny a navíc byl podle předběžných výsledků posouzen, jako potenciálně dráždivý pro dýchací cesty člověka. V roce 2004 bylo proto úřadem EFSA požádáno o doplňující informace a testy pro použití tohoto kmenu. K podobnému závěru došel úřad EFSA např. i u kmene *L. reuteri* NBF-1, který byl taktéž označen, jako potenciálně dráždivý pro dýchací cesty a zároveň bylo požádáno o lepší průkaz efektivity probiotického působení této bakterie u psů²⁸.

Požadavky na bezpečné použití např. nebyly splněny ani u *Bifidobacterium animalis*, jelikož kmen je prokazatelně rezistentní vůči antibiotiku klindamycinu bez jakéhokoli objasnění molekulární podstaty této rezistence. Podle dodaných materiálů navíc úřad EFSA rozhodl, že efekt tohoto probiotika na střevní mikroflóru psa je jednoznačně neprokázán²⁶.

Prozatím jediným druhem spadající do skupiny sporetvorných bakterií, ke kterému bylo vydáno odborné stanovisko úřadu je kmen *B. subtilis* DSM 15544 užitý v komerčním preparátu Calsporin²⁷. U tohoto kmene bylo prokázáno, že neprodukuje žádné toxiny a zároveň nevykazuje rezistenci vůči antibiotikům významným v humánní nebo veterinární medicíně. Jelikož je navíc *B. subtilis* s uznaným statutem QPS, byl preparát označen za pravděpodobně bezpečný pro použití u různých druhů zvířat, včetně psů. Stejně tak byl popsán u tohoto přípravku alespoň minimální pozitivní vliv na konzistenci a texturu stolice psů.

Kromě zmíněných druhů registrovaných v EU je na světovém trhu dostupná celá škála dalších probiotik a symbiotik, která jsou buďto schválená např. statutem GRAS (vydaným Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv Spojených Států Amerických), popř. jsou k dispozici i zahraniční probiotika, jejichž bezpečnost a účinnost nebyla oficiálně nikdy schválena ani testována. Největší zastoupení na světovém trhu náleží preparátům obsahující *E. faecium*, popř. v kombinaci s dalšími bakteriemi, jako jsou ve většině bakterie mléčného kvašení. Na trhu lze ale nalézt i komerčně dostupné preparáty obsahující další bakteriální druhy, popř. kvasinky nebo dokonce houby, nejčastěji *Aspergillus oryzae*.

Zkušenosti s testy vybraných probiotik na psech

E. faecium je v současnosti nejvíce používaný probiotický kmen u malých zvířat. Přesto, že je prokázáno jeho pozitivní působení na mnoho živočišných druhů, o jeho přesném působení a účincích neexistuje prozatím příliš exaktních dat, která by bylo možné mezi sebou porovnat. V roce 2003 provedla společnost Nestle Purina Product Technology Centre velký experiment, jehož cílem bylo lépe pochopit a popsat účinky přídatku *E. faecium* do psiho krmiva²⁹. V tomto experimentu se pracovalo se dvěma skupinami psů (konkrétně zdravých

štěňat), kontrolní skupina dostávala klasické, kompletní psí granule vyrobené zmíněnou společností a u druhé skupiny byla stejná potrava obohacena o dávku *E. faecium* 10415 v dávce 5×10^8 cfu/den. Takto byli psi krmeni po dobu jednoho roku. U štěňat s probiotiky byla prokázána zvýšená koncentrace imunoglobulinů IgA v séru a výkalech. Zároveň se u nich zvýšil titr protilátek proti viru psinky, proti které byly v průběhu testu očkovány. Samozřejmě u ovlivněných štěňat došlo také ke vzrůstu počtu *E. faecium* ve výkalech. Na druhou stranu se ale nezměnil žádný z dalších sledovaných parametrů, jako byly váha, týdenní a měsíční přírůstek či krevní obraz.

V dalších ze studií efektu *E. faecium* na zdravé psy byl použit kmen izolovaný z komerčního psiho kompletního krmiva obohaceného právě o *E. faecium*³⁰. Tento kmen byl potom *in vitro* nakultivován a podáván zdravým psům různých plemen a stáří po dobu jednoho týdne v denní dávce $2 - 3 \times 10^9$ cfu/den. Dále byly sledovány různé biochemické parametry a složení fekálního vzorku v čase 1, 2 a 3 měsíce o ukončení experimentu. Test neměl obecně žádné nežádoucí účinky na žádného ze psů. Enterokoky byly patrné ve fekálním vzorku prokazatelně ještě po 3 měsících od ukončení experimentu; kromě toho ve fekálním vzorku ovlivněných psů také výrazně stoupla frakce bakterií mléčného kvašení a zároveň výrazně poklesl počet bakterií rodu *Pseudomonas* a *Staphylococcus*. U většiny psů byl také zaznamenán pokles sérových lipidů a proteinů, což obecně souviselo především s poklesem sérového cholesterolu. V závěru práce je díky tomuto zjištění označen *E. faecium* také jako mimořádně vhodný k podpoře léčby psí obezity.

Lactobacillus a Bifidobacterium

Studie přídatku těchto bakterií byly provedeny opět výhradně u zdravých psů. Např. podávání kmene *L. acidophilus* DSM 13241 zdravým dospělým psům vedlo k velice rychlým změnám v hematologických parametrech, jako bylo zvýšení počtu červených krvinek, hematokritu, celkového hemoglobinu, zvýšení počtu bílých krvinek i sérových imunoglobulinů rodiny IgG. V práci je tento výsledek prezentován, jako úspěch nicméně nebylo prokázáno, jestli tyto změny měly na psy pozitivní, neutrální či naopak i potenciálně negativní účinek.

V jiné studii byl podáván vzorku patnácti zdravých psů kmen *L. fermentum* izolovaný z výkalů zdravého psa. Tento kmen byl zároveň testován *in vitro* na přežití v prostředí s pH 3 a s přítomností 1% žluči, přičemž vykazoval velice dobrou hodnotu přežití³¹. Podaná dávka byla $3 \cdot 10^9$ cfu/den a tato byla podávána po dobu 7 dní. Při následných testech bylo odhaleno, že došlo k zásadnímu zvýšení laktobacilů a enterokoků ve fekálním vzorku a zároveň došlo ke vzrůstu celkových sérových proteinů a lipidů. Zároveň byly ve střevech redukovány bakterie rodu *Clostridium* a Gram-negativní druhy, jako např. *Pseudomonas* a koliformní bakterie³². I tato práce byla v závěru označena za úspěch, zůstává ovšem opět otázkou, jestli pozorované změny měly opravdu pozitivní vliv na zdraví psů a zda např. pohled klostridií ve fekálním vzorku nemůže být naopak negativní vzhledem ke složení přirozené mikroflóry psiho zažívacího traktu

(viz výše). V práci potom chyběly informace o tom, jestli se jednalo např. primárně o pokles zastoupení bakterie *C. perfringens* nebo se jednalo primárně o jiné druhy.

K zásadnímu zvýšení koncentrace laktobacilů ve fekálním vzorku došlo např. i po podání kmene *L. animalis* LA4 izolovaného z výkalů zdravého psa. V tomto případě, ale došlo zároveň k zásadnímu poklesu koncentrace enterokoků³³. Při podávání kmene *Bifidobacterium animalis* AHC7 nebyly taktéž zaznamenány žádné vedlejší účinky a byla popsána zvýšená koncentrace fekálních bakterií mléčného kvašení a zároveň snížení koncentrace koliformních bakterií³⁴.

U psů bylo také experimentálně odzkoušeno použití geneticky modifikované bakterie *L. casei*, která měla pomocí genetické modifikace do své DNA vložený gen pro produkci biologicky aktivního granulocytárního kolonizačního faktoru. Ovlivněná skupina psů dostávala dávku 1×10^9 cfu/den po dobu sedmi týdnů. Podávání preparátu vedlo ke značnému zvýšení koncentrace monocytů, sérových imunoglobulinů rodiny IgA a ke zvýšení titru protilátek proti naočkovánému psímu koronaviru³⁵.

Sporotvorné bakterie

Sporotvorné bakterie rodu *Bacillus* jsou někdy považovány za lepší alternativu, než jsou např. bakterie mléčného kvašení, jelikož je u nich mnohem lepší předpoklad přežití v prostředí trávicího traktu, ale i zachování viability při zpracování, sušení, transportu, skladování i podávání. V řadě zemí jsou dnes k dispozici na trhu probiotika obsahující probiotický kmen *Bacillus* pro použití u lidí i zvířat³⁶.

Pro použití u psů byl testován např. *Bacillus* CIP 5832, jehož spory přežívají dlouhodobě v psím krmivu i po agresivním sušení a lisování. Stejně tak tento kmen přežívá bez větších obtíží průchod žaludkem a dalšími oddíly psího trávicího traktu. Na druhou stranu byla při použití detekovatelná přítomnost tohoto kmene ve fekálním vzorku maximálně 3 dny po skončení jeho užívání, což vedlo k závěrům, že tento bakterie patrně není

schopná dlouhodobě adherovat a přežívat v prostředí psího střeva³⁷.

U kmene *B. subtilis* C-3102 bylo prokázáno, že účinně zlepšuje texturu psí stolice kvůli snížení celkového detekovatelného amoniaku³⁸. Na druhou stranu nebylo opět nikterak prokázáno, jestli toto snížení koncentrace amoniaku má pozitivní vliv na zdraví psa, popř. že dokonce nemá účinky negativní.

Závěr

Probiotické kultury mohou být velice prospěšné jak pro lidi, tak pro zvířata. Jejich použití umožňuje v chovatelství např. větší přírůstky, celkově větší „well-fare“ chovaných zvířat, je možné s jejich pomocí přecházet některým nemocem a zdravotním problémům i bez použití antibiotik nebo jiných chemických látek a je také možné urychlit případné léčení určitých nemocí. Pro použití u malých zvířat je prozatím v EU registrován poměrně malý počet mikrobiálních druhů, které jsou využitelné jako probiotické kultury. Nejrozšířenější jsou jednoznačně preparáty obsahující různé kmeny bakterie *E. faecalis*, a to i přesto, že mechanismus jeho pozitivního působení na zvířata není dodnes jednoznačně objasněn. Druhým nejrozšířenějším přístupem je použití bakterií mléčného kvašení, jako jsou hlavně bakterie spadající do druhu *Lactobacillus*, popř. také sporotvorných bakterií, jakou jsou bakterie rodu *Bacillus*. Bohužel, vědeckých studií zkoumajících vliv probiotik na mikroflóru a zdraví psů je prozatím jen málo a navíc je není možné dobře porovnávat mezi sebou kvůli velice rozdílným přístupům i použitým mikrobiálním kulturám. Využití probiotik u psů je každopádně stále velice slibnou problematikou pro budoucí využití v komerčních probiotických preparátech, krmivech a dalších produktech.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena z projektu TAČR č. **TN01000048 – Národní Centrum kompetence „Biorafinace jako oběhové technologie“**.

Literatura

1. Lilly DM, Stillwell RH.: *Science*. 147, 747 (1965).
2. Fuller R.: *J Appl Bacteriol*. 66, 365 (1989).
3. Suchodolski JS, Ruaux CG, Steiner JM, et al.: *Am J Vet Res*. 66, 1556 (2005).
4. Schmitz S, Suchodolski J.: *Vet Med Sci*. 2, 71 (2016).
5. Garcia-Mazcorro JF, Dowd SE, Poulsen J, et al.: *Microbiologyopen*. 1, 340 (2012).
6. Xenoulis PG, Palculict B, Allenspach K, et al.: *FEMS Microbiol Ecol*. 66, 579 (2008).
7. Suchodolski JS, Camacho J, Steiner JM.: *FEMS Microbiol Ecol*. 66, 567 (2008).
8. Suchodolski JS, Dowd SE, Westermarck E, et al.: *BMC Microbiol*. 9, 210 (2009).
9. Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, et al.: *ISME J*. 5, 639 (2011).
10. Kogut MH, Arsenault R.: *Front Vet Sci*. 3, 71 (2016).
11. Viswanathan VK, Hodges K, Hecht G.: *Nat Rev Microbiol*. 7, 110 (2009).
12. Marks SL, Kather EJ, Kass PH, et al.: *J Vet Intern Med*. 16, 533 (2002).
13. Busch K, Suchodolski JS, Kuhner KA, et al.: *Vet Rec*. 176, 253 (2015).
14. Redfern A, Suchodolski J, Jergens A.: *Vet Rec*. 181, 370 (2017).
15. Guard BC, Barr JW, Reddivari L, et al.: *PLoS One*. 10, e0127259 (2015).
16. Minamoto Y, Dhanani N, Markel ME, et al.: *Vet Microbiol*. 174, 463 (2014).
17. Bell JA, Kopper JJ, Turnbull JA, et al.: *Interdiscip Perspect Infect, DiS*. 149, 694 (2008).
18. Suchodolski JS, Xenoulis PG, Paddock CG, et al.: *Vet Microbiol*. 142, 394 (2010).
19. Honneffer JB, Minamoto Y, Suchodolski J.: *World J Gastroenterol*. 20, 16489 (2014).
20. Aquilina G, Bories G, Brantom P, et al.: *EFSA Journal*. 7, 1379 (2009).

Literatura (pokračování)

21. Aquilina G, Bach A, Bampidis V, et al.: *EFSA Journal*. 11, 3098 (2013).
22. Aquilina G, Bampidis V, Bastos MDL, et al.: *EFSA Journal*. 12, 3906 (2014).
23. Anadon A, Arzo MA, Bories G, et al.: *EFSA Journal*. 52, 1 (2004).
24. Azimonti G, Bampidis V, Bastos MDL, et al.: *EFSA Journal*. 17, 5524 (2019).
25. Aquilina G, Bampidis V, Bastos MDL, et al.: *EFSA Journal*. 14, 4340 (2016).
26. Aquilina G, Bach A, Bampidis V, et al.: *EFSA Journal*. 10, 2964 (2012).
27. Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, et al.: *EFSA Journal*. 15, 4760 (2017).
28. Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, et al.: *EFSA Journal*. 16, 5278 (2018).
29. Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GL, Cavadini C, et al.: *J Nutr*. 133, 1158 (2003).
30. Marcinakova M, Simonova M, Stropfova V, et al.: *Folia Microbiol*. 51, 239 (2006).
31. Stropfova V, Marcinakova M, Simonova M, et al.: *Anaerobe*. 12, 242 (2006).
32. Stropfova V, Laukova A, Gancarcikova S.: *Folia Microbiol*. 57, 347 (2012).
33. Biagi G, Cipollini I, Pompei A, et al.: *Vet Microbiol*. 124, 160 (2007).
34. Kelley R., Park JS, O'mahony L, et al.: *Vet Ther*. 11, 1 (2010).
35. Chung JY, Sung EJ, Cho CG, et al.: *J Microbiol Biotechnol*. 19, 1401 (2009).
36. Biourge V, Vallet C, Levesque A, et al.: *J Nutr*. 128, 2730 (1998).
37. German AJ, Helps CR, Hall EJ, et al.: *Dig Dis Sci*. 45, 7 (2000).
38. Felix AP, Netto MVT, Murakami FY, et al.: *Ciencia Rural*. 40, 2169 (2010).

Souhrn

Kolek J., Patáková P. : Problematika využití probiotik u psů

Využití probiotik u lidí či zvířat může mít mnoho zdravotních benefitů a to jak u zdravých, tak i u nemocných jedinců. Problematika využití probiotik u malých zvířat, jako jsou například psi a kočky, prozatím není příliš komplexně popsána. I přes tuto skutečnost je dnes k dispozici v EU několik schválených probiotických kultur pro psy. Mezi nejčastěji používané probiotické organismy patří u psů především bakterie rodu *Enterococcus*, dále potom bakterie mléčného kvašení či některé sporotvorné bakterie, jako např. bakterie rodu *Bacillus*.

Klíčová slova: probiotika, pes, EFSA, QPS, mikroflóra, *Enterococcus*

Summary

Kolek J., Patakova P. : Use of probiotics in dogs

Use of probiotic cultures can provide many health benefits for healthy as well as health compromised people or animals. Issue of use of probiotics in small animals, like cats and dogs, has not been described satisfactorily to these days. Despite this fact, several approved probiotic cultures for use in dogs are available in EU. The most frequently used cultures include especially *Enterococcus* bacteria, lactic acid bacteria or some spore forming strains like *Bacillus*.

Keywords: probiotics, dog, EFSA, QPS, microflora, *Enterococcus*

CHARAKTERISTIKA MINERÁLNÍCH RADONOVÝCH PRAMENŮ A JEJICH MIKROBIÁLNÍHO OSÍDLENÍ

Elizaveta Tímkina, Olga Mařátková

Ústav Biotechnologie, VŠCHT Praha; timkinae@vscht.cz, olga.matatkova@vscht.cz

Úvod

Mezi mikroorganismy lze pozorovat největší rozmanitost forem života, které můžeme nalézt v rozmanitých prostředích, z nichž mnohá považujeme za extrémní. Život mikroorganismů v ekologických nikách je omezen pouze několika faktory, nejčastěji jsou uváděny extrémně vysoká teplota (nad 121 °C), extrémně kyselé nebo alkalické pH (pod 0,5 a nad 12,5) a omezená dostupnost vody. Mikroorganismy se tudíž nachází v mnoha habitatech, lze je nalézt v horkých pramenech, mořích, ledovcích, atmosféře, půdě i podpovrchových vodních zdrojích. Rozmanitost a specifita těchto prostředí s sebou nese i pestrost mikrobiálních společenství v nich přítomných. Současné studie v oblasti rozmanitosti a metabolického potenciálu mikrobiomu extrémních prostředí, včetně podzemních vod jsou v raných stádiích výzkumu¹.

Mezi zajímavé lokality pro zkoumání mikrobiálních společenství patří prostředí pramenů a podzemních vod. Podzemní minerální vody jsou prostředím s podmínkami výrazně odlišnými od povrchových vod. Pouze

malé množství mikroorganismů je schopno existovat za specifických podmínek, které často s prostředím podzemních vod souvisí, jako je nepřítomnost světla; nízká koncentrace organických substrátů; přítomnost toxických látek, například těžkých kovů; extrémně vysoké teploty horkých pramenů; vysoká salinita; extrémní hodnoty pH a v neposlední řadě přítomnost prvků emitujících ionizující záření. Kombinace uvedených specifických podmínek a izolované umístění podzemní vody způsobují vývoj unikátních mikrobiálních společenství, které jsou charakteristické odlišným zastoupením mikroorganismů, a to i v rámci různých částí vodních těles či v jednotlivých pramenech, které mají původ ze stejné zvodně^{1,2}.

Z hlediska biotechnologického potenciálu jsou mikroorganismy izolované z prostředí pramenů zdrojem nových sloučenin pro průmysl, známým příkladem jsou termotabilní enzymy jako je *Taq* DNA polymerasa³. Unikátní metabolické dráhy vyvinuté u mikroorganismů dlouhodobě vystavených např. vysokým koncentracím těžkých kovů jsou využitelné v bioreme-

diacních technologiích při odstraňování nebo biofixaci toxických kovů⁴. Z hlediska základního výzkumu jsou podzemní minerální vody prostředím, které jsou dosud jen málo prozkoumány. Nejvíce prostudovanými prameny v současné době jsou termální prameny Obsidian Pool a Octopus Spring v národním parku Yellowstone (USA), ve kterých jsou hlavními zástupci termofilní bakterie a archea. Studium mikroorganismů z těchto pramenů přispělo i k pochopení vývoje časných forem života na Zemi. Příkladem takového výzkumu mohou být například evoluční fylogenetické stromy sestavené na základě sekvenace genů pro 16S rRNA svědčící o tom, že mikroorganismy ze současných pramenů jsou blízkými příbuznými prvních forem života. Tyto poznatky vedly k vzniku hypotézy, že život na Zemi se vyvinul v blízkosti podvodních termálních pramenů^{5,6}.

Radonové prameny ve světě

Mezi ve světě ojedinělé patří minerální radonové prameny. Radon je bezbarvý radioaktivní plyn rozpustný ve vodě, je meziproduktem uran – radiové a thoriové rozpadových řad. Radon vzniká bezprostředně po rozpadu radia. Nejstabilnější izotop radonu ²²²Rn má poločas rozpadu 3,8 dní. Izotopy radonu podléhají *alfa* rozpadům, hlavním produktem obou rozpadových řad je těžký kov olovo 207 Pb nebo 206 Pb. Aktivita ²²²Rn se vyjadřuje v odvozených jednotkách SI Bq/m³⁷.

Vysoké koncentrace radonu byly stanoveny v různých minerálních pramenech po celém světě, mnohé z těchto pramenů jsou využívány k léčbě lidských onemocnění. V Evropě mezi nejznámější radonové prameny patří zdroje v městech Bad Gastein a Bad Zell v Rakousku; Niška Banja v Srbsku; Menzenschwand, Bad Kreuznach, Bad Brambach, Bad Münster, Bad Schlema, Bad Steben a Sibyllenbad v Německu; Jáchymov v České republice; Naretschen a Kostenez v Bulharsku. V USA jsou pro léčbu aktivně využívány prameny v městě Boulder, Montana⁸.

Pramen s názvem Franz-Josef-Quelle se nachází v lázeňském městě Bad Gastein, Rakousko. Celková mineralizace vody je okolo 350 mg/l, průměrná teplota 45,6 °C a pH 8. Voda vytéká z umělého vrtu s celkovým množstvím ²²²Rn 296 kBq/m³. Doba zdržení vody je v rozmezí 3600–3800 let, v blízkosti vrtu dochází ke smíchání podzemní termální vody s 10 % studené podpovrchové vody⁹.

Některé radonové prameny se vyznačují vysokou teplotou a mohou být klasifikovány jako termální, mezi tyto patří pramen Paralana v jižní části Austrálie. K ohřívání vody dochází v důsledku geotermální aktivity a radioaktivity přítomných prvků. Maximální teplota vody z pramene je 63 °C. Hodnoty aktivity radonu ve vodě se pohybují v rozmezí 2000 – 5800 kBq/m³, v plynu byly pozorovány hodnoty aktivity až 29000 kBq/m³¹⁰.

Prameny v českém lázeňském městě Jáchymov se vyznačují unikátně vysokou koncentrací rozpuštěného radonu. Objev radioaktivních minerálních vod je těsně spojen s těžbou kovů. Minerální voda je zde v kontaktu s uranovými žilami, které jsou součástí horského granitového masivu. Neobvyklý termální pramen o teplotě 28 °C, později pojmenován Curie, byl nalezen v roce

1864 v 12. patře dolu Svornost. V současné době jsou využívány 4 prameny a celkový průtok minerální vody činí 300 l/min, celková mineralizace 0,7 g/l. Obsah uranu v pramenech je v rozmezí 0,01 – 0,08 mg/l. Průměrné aktivity radonu a radia v jednotlivých pramenech jsou následující:

- Běhounek: Ra – 7,55 kBq/m³, Rn – 11 100 kBq/m³ (teplota 36 °C);
- C1: Ra – 2,48 kBq/m³, Rn – 13 300 kBq/m³ (teplota 29 °C);
- Curie: Ra – 2,36 kBq/m³, Rn – 6600 kBq/m³ (teplota 29 °C);
- Agricola: Rn – 20000 kBq/m³ (teplota 29 °C)¹¹.

Mikrobiom radonových pramenů

Hlavní biotopy prokaryot se nacházejí pod povrchem půdy a lze tedy očekávat, že celkový počet podpovrchových prokaryot převyšuje počty nacházející se v ostatních složkách biosféry¹². Celkové stanovitelné počty bakterií v podzemních vodách se pohybují v rozmezí 10² až 10⁶ buněk/cm³ vzorku vody a 10⁴ až 10⁸ buněk/cm³ sedimentu¹³. Kromě bakterií mezi další mikroorganismy vyskytující se v podzemních vodních systémech patří *Archaea* i *Eukaryota*. Většina mikroorganismů žije v daném prostředí v podobě biofilmu přichyceného na minerální částice, planktonický způsob je méně častý. Tvorba biofilmu se jeví jako výhodný způsob existence za podmínek limitace nutrienty^{14, 15}.

Pro studium ekosystémů pramenů se používají různé techniky, a to jak kultivační s následnou izolací, tak i metodiky založené na analýzách nukleových kyselin přítomných mikroorganismů jako je sekvenace genu pro 16S rRNA a postupy metagenomiky^{2,16}. Rané studie mikrobiomu se spoléhaly na kultivační techniky. Tyto techniky ukázaly malou rozmanitost bakteriálních druhů v podzemních minerálních vodách, přičemž většina získaných izolátů byla blízko příbuzná všeobecně známým heterotrofům z kmenů *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a *Firmicutes*. Tento zjednodušený pohled v současné době už není považován za správný, hlavně z toho důvodu, že získaná data byla omezená dostupností kultivačních médií přizpůsobených pro kultivaci hlavně zástupců kmenů *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Actinobacteria*, které ale nemusí být v minerálních vodách dominantní. Dané techniky zkreslují rozmanitost druhů a většina získaných izolátů je blízko příbuzná dobře prozkoumaným bakteriím žijícím na zemském povrchu^{16,17}. Stejně jako v jiných prostředích se pro popis mikrobiální biologické rozmanitosti v ekosystémech podzemních vod ukázala jako nejúčinnější právě metagenomika, která spočívá v přímé extrakci genetického materiálu ze vzorku zkoumaného prostředí, klonování a fylogenetické analýze. Za použití postupů nezávislých na kultivaci byla objevena řada nových mikroorganismů, které často tvoří podstatný podíl mikrobiálních společenstev přítomných v systémech podzemních vod¹⁸⁻²⁰.

Radonové prameny nebyly dosud předmětem mnoha studií z hlediska jejich mikrobiomu a existuje tedy pouze omezené množství přehledových informací o mikroorganismech tohoto typu prostředí. V práci Weidler a kol. (2007) bylo analyzováno mikrobiální

společenství radonového pramene Franz-Josef-Quelle. Celkem bylo nalezeno 415 unikátních klonů, z nichž 283 bylo původem z domény *Archaea* a 132 z domény *Bacteria*. Na základě získaných sekvencí byly vyčleněny 4 skupiny *Archaea* a 14 skupin *Bacteria*. Většina bakterií a archea nalezených ve vzorcích vody z pramene Franz-Josef-Quelle jsou dosud nekultivovatelné za využití obvyklých laboratorních kultivačních technik. 99 % klonů z domény *Archaea* bylo nejvíc podobné různým zástupcům kmene *Crenarchaeota*. Porovnáním s literaturou byla zjištěna podobnost genomů zástupců *Archaea* se vzorky z prostředí kontaminovaného uranem (uranové doly) nebo z prostředí oceánských hydrotermálních pramenů. U zástupců bakterií byla zjištěna větší rozmanitost než u složení společenství *Archaea*. Jednotlivé skupiny klonů domény *Bacteria* vykazovaly podobnost izolátům z uranových dolů, prostředí kontaminovaného trichlorethenem, annamox bakteriím (schopné anaerobní oxidace amoniaku), methanotrofním bakteriím a izolátům ze subtropických sladkovodních bažin či šelfových sedimentů z Antarktidy. V bakteriálním společenství pramene Franz-Josef-Quelle převládá kmen *Proteobacteria*, hlavně δ -*Proteobacteria* a β -*Proteobacteria*, dále byla pozorována podobnost několika skupin zástupců kmene *Nitrospirae* (hlavně rod *Nitrospira*). Podobnost některých klonů z pramene Franz-Josef-Quelle mikroorganismům z uranových dolů je velice zajímavá z toho důvodu, že pro pramen Franz-Josef-Quelle je charakteristická vysoká koncentrace radioaktivního uranu a radonu. Zjištěná přítomnost genů skupiny *amoA* (ammonia monooxygenase subunit A), zástupců kmene *Nitrospirae*, kteří jsou schopni oxidovat dusitany, včetně bakteriální sekvence podobné annamox bakteriím naznačuje, že v ekosystému pramene Franz-Josef-Quelle probíhá celý cyklus koloběhu dusíku⁹.

Studie ekosystému termálního radonového pramene Paralana (Austrálie) také ukazuje na přítomnost zástupců δ -*Proteobacteria* a β -*Proteobacteria*, rovněž byli nalezeni zástupci rodu *Nitrospira*¹⁰. V tomto případě byla zjištěna přítomnost nekultivovatelných kmenů s vysokou podobností mikrobiomu horkých pramenů v parku Yellowstone²¹. Podobně jako u pramene FJQ měl i zde jeden klon vysokou podobnost s bakteriálními izoláty ze vzorku podzemní vody v blízkosti uranového dolu popsáního v práci Chang a kol. (2001)²².

Adaptace mikroorganismů na stresové podmínky radonových pramenů

Mikroorganismy, které se vyskytují v radonových pramenech, jsou vystaveny v první řadě působení radioaktivních prvků a oxidačních činidel, které vznikají v důsledku přítomnosti ionizujícího záření. Vysoké koncentrace těžkých kovů, které jsou produkty rozpadových řad, jsou dalším stresovým faktorem radonových pramenů. Pro přežití za těchto stresových podmínek jsou mikroorganismy nuceny vyvíjet specifické adaptační mechanismy⁹.

Jedním z nejdůležitějších adaptačních mechanismů mikroorganismů radonových pramenů je odolnost vůči záření. Pro radonové prameny je charakteristické

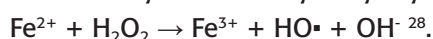
alfa záření, které se řadí mezi ionizující. Vývoj těchto adaptačních mechanismů není dosud zcela objasněn, vzhledem k omezené přítomnosti vysokých hladin ionizujícího záření v průběhu vývoje života. Předpokládá se, že v případě radiorezistentní bakterie *Deinococcus radiodurans*, je odolnost vůči záření těsně spojená s mechanismy adaptace na extrémní vysychání, u nichž byly zjištěny podobné principy²³. U jiných mikroorganismů, například zástupci domény *Archaea* *Thermococcus gammatolerans* a *Pyrococcus furiosus*, je odolnost vůči působení ionizujícího záření spojována s adaptací na extrémně vysoké teploty^{24, 25}. Za laboratorních podmínek byla radiorezistence uměle vyvolána u bakterie *Escherichia coli* v důsledku opakovaného ozáření zdrojem *gamma* záření²⁶. Tyto poznatky o existenci odolnosti vůči ionizujícímu záření u fylogeneticky nepříbuzných kmenů svědčí o jejím nezávislém opakovaném vývoji v průběhu evoluce.

Hlavní mechanismy odolnosti vůči působení ionizujícího záření můžeme zařadit do následujících skupin:

- Snížení oxidace proteinů pomocí sofistikovaného antioxidačního systému (chemického či enzymatického);
- Vysoce přizpůsobivé mechanismy opravy DNA;
- Kondenzace DNA pomocí histone-like proteinů, která chrání DNA před poškozením radikály a zjednodušuje opravu DNA²⁷.

Ionizující záření může poškozovat biomolekuly přímým způsobem, při kterém dochází k ionizaci přímo biomolekul, nebo nepřímým způsobem. Nepřímým působením ionizujícího záření nejdříve vznikají reaktivní formy kyslíku, které následně poškozují molekuly DNA a proteiny. Molekuly vody uvnitř buněk podléhají radiolýze, která spočívá v homolytickém štěpení vazby O – H za vzniku hydroxylového radikálu HO•. Vzhledem k velkému obsahu vody v živých buňkách je tento mechanismus vzniku reaktivních radikálů považován za hlavní. Hydroxylový radikál má vysokou oxidační kapacitu ale krátkou dobu existence, a proto poškozuje pouze nejbližší molekuly, přičemž nevykazuje žádnou reakční specifitu a poškozuje všechny typy organických molekul (DNA, RNA, lipidy a bílkoviny)²⁸.

Sekundárním zdrojem hydroxylových radikálů v poškozených buňkách je Fentonova reakce. Železnaté ionty jsou oxidovány působením peroxidu vodíku za vzniku železitých iontů a hydroxylových radikálů:



Poškození DNA působením ionizujícího záření se může projevit ve formě jedno či dvou řetězcových zlomů nebo modifikaci bází, velké množství takových změn může být pro buňku fatální. Odolné buňky jsou však schopny přežít stovky zlomů DNA způsobených ionizujícím zářením. Pozoruhodným faktem je, že buňky odolné vůči působení ionizujícího záření a buňky citlivé trpí na stejné množství poškození DNA. Na základě studií je přepokládáno, že mechanismus adaptace spočívá ve vysoké aktivitě opravných mechanismů DNA, nikoli v její ochraně. Enzymatická výbava reparačních mechanismů jednotlivých kmenů se liší, ale zachování její aktivity po působení subletálních dávek ionizujícího záření je pro buňky odolné vůči ionizujícímu záření zásadní^{29,30}. Aktivní formy kyslíku rovněž poškozují

buněčné proteiny, většinou se jedná o oxidační reakce. Na rozdíl od odolných kmenů, senzitivní buňky snadno podléhají oxidačnímu poškození proteinů působením ionizujícího záření. U bakteriálních buněk s vysokou odolností vůči ionizujícímu záření a vysychání byla pozorována nižší míra oxidace proteinů než u buněk náchylných³¹. Snížení oxidačního stresu a s tím spojená ochrana proteinů je zajišťována několika mechanismy, mezi které řadíme vysoký poměr manganatých iontů vůči iontům železa, produkci enzymů s antioxidační aktivitou a přítomnost pigmentů nebo polynenasycených mastných kyselin s antioxidační kapacitou³².

Bylo zjištěno, že buňky s vysokým vnitrobuněčným poměrem iontů Mn:Fe mají výrazně vyšší odolnost vůči působení ionizujícího záření než buňky s velkým obsahem železa. Náhrada železnatých iontů pomocí manganatých v aktivních místech enzymů umožňuje zachování jejich aktivity, přičemž intenzita průběhu Fentonovy reakce a s tím spojený oxidační stres zůstává nízký³³.

Antioxidační enzymy hrají důležitou roli při detoxifikaci reaktivních forem kyslíku. Jedná se hlavně o enzymy thioredoxin reduktasu (*trxB*), proteiny podobné glutaredoxinu (*glp*), glutathion-vázající proteiny (*gsiB*), superoxid dismutasu (*sodA*), katalasu (*katE*) a jiné²⁷. Některé z těchto enzymů vyžadují kovový kofaktor. U radiorezistentních bakterií jsou často pozorovány mangan závislé formy superoxid dismutasy a katalasy³⁴. Neezymové antioxidanty, například karotenoidní pigmenty jsou společným prvkem radiorezistentních bakterií. Díky své struktuře karotenoidy mají velkou kapacitu odbourávat volné radikály a pohlcovat UV záření^{35, 36}. Dalším adaptačním mechanismem řady bakteriálních buněk je zvýšení produkce polynenasycené eikosapentaenové kyseliny, což rovněž vede ke snížení efektu působení reaktivních forem kyslíku a volných radikálů na buněčné struktury a komponenty³⁷.

Těžké kovy jsou často přítomny v radonových pramenech, jedná se například o olovo, které je finálním produktem rozpadové řady uranu. Ve studii Nayak a kol. (2020) byly popsány bakteriální izoláty z radonové

vody schopné tolerovat celkové koncentrace těžkých kovů až 8,5 mM³⁸. U mnoha mikroorganismů žijících v prostředí kontaminovaném vysokými koncentracemi těžkých kovů byly popsány transmembránové pumpy, specifické pro přenos určitých iontů, které svojí vysokou aktivitou zajišťují udržení optimálních podmínek uvnitř buňky³⁹.

Teploty vody v radonových pramenech mohou dosahovat vysokých hodnot, proto zde vyskytující mikroorganismy lze řadit i mezi termofilní, v tomto případě významnou roli u nich hrají i adaptační mechanismy na zvýšenou teplotu okolního prostředí. Vysoké teploty způsobují mimo jiné poškození buněk v podobě denaturace bílkovin a dvou řetězcových zlomů DNA. Termofilní mikroorganismy vyvinuly rozmanité mechanismy udržování homeostáze při vysokých teplotách. Mezi tyto mechanismy se řadí inkorporace většího množství nabitých aminokyselin do bílkovin a přítomnost specifických komponent v cytoplasmatické membráně a buněčné stěně⁴⁰. Mechanismy opravy poškození DNA u termofilních mikroorganismů mohou být taky využity při opravách DNA způsobených ionizujícím zářením nebo vysycháním⁴¹. V literatuře je popsáno několik termofilních nebo hypertermofilních bakteriálních kmenů, které snášejí vysoké dávky ionizujícího záření, například *Rubrobacter radiotolerans* nebo *Thermococcus radiotolerans*⁴².

Závěr

Mikrobiom radonových pramenů je v současné době málo prozkoumán, ale jeví se jako zdroj nových mikrobiálních kmenů, s potenciálně technologicky využitelnými vlastnostmi. Velkou překážkou je ale málo informací jak o konkrétních mikrobiálních kmenech, tak o jejich adaptačních strategiích jak z kultivačního, tak z molekulárního hlediska. Výzkum v této oblasti je tedy velmi perspektivní, jak z hlediska rozšíření informací o stresových odpovědích mikroorganismů na extrémní podmínky, tak z hlediska jejich potenciálního biotechnologického využití.

Literatura

- Hendry P: *Environ. Chem.* 3(2), 75 (2006).
- Griebler C and Lueders T: *Freshwater Biology* 54(4), 649 (2009).
- Chien A, Edgar DB, et al.: *J. Bacteriol.* 127(3), 1550 (1976).
- Nesheli MA, Asgarani E, et al.: *Chem. Ecol.* 34(2), 163 (2018).
- Woese CR: *Microbiol. Rev.* 51(2), 221 (1987).
- Barns SM, Fundyga RE, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(5), 1609 (1994).
- Baskaran M: *Radon: a Tracer for Geological, Geophysical and Geochemical Studies*, Cham, SWITZERLAND: Springer International Publishing AG (2016).
- Erickson BJ: *Dose-Response* 5, 48 (2007).
- Weidler GW, Dornmayr-Pfaffenhuemer M, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1), 259 (2007).
- Anitori RP, Trott C, et al.: *Astrobiology* 2(3), 255 (2002).
- Krejbichova Z: *Czech. J. Phys.* 49, 127 (1999).
- Gibert J and Deharveng L: *Bioscience* 52(6), 473 (2002).
- Whitman WB, Coleman DC, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(12), 6578 (1998).
- Bouwer EJ and McCarty PL: *Ground Water* 22(4), 433 (1984).
- Griebler C, Mindl B, et al.: *Aquat. Microb. Ecol.* 28(2), 117 (2002).
- Zlatkin IV, Schneider M, et al.: *J. Indust. Microbiol.* 17(3 – 4), 219 (1996).
- Ghiorse WC and Wilson JT: *Adv. Appl. Microbiol.* 33, 107 (1988).
- Pedersen K, Arlinger J, et al.: *Mol. Ecol.* 5(3), 427 (1996).
- Eisen JA: *PLoS. Biol.* 5(3), 384 (2007).
- Bohannon BJM and Hughes J: *Curr. Opin. Microbiol.* 6(3), 282 (2003).
- Hugenholtz P and Pace NR: *Trends Biotechnol.* 14(6), 190 (1996).

Literatura (pokračování)

22. Chang YJ, Peacock AD, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67(7), 3149 (2001).
23. Munteanu A, Uivarosi V, et al.: *Extremophiles* 19(4), 707 (2015).
24. Zivanovic Y, Armengaud J, et al.: *Genome Biol.* 10(6), 76 (2009).
25. Williams E, Lowe TM, et al.: *Extremophiles* 11(1), 19 (2007).
26. Byrne RT, Klingele AJ, et al.: *eLife* 3, 18 (2014).
27. Pavlopoulou A, Savva GD, et al.: *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* 767, 92 (2016).
28. Halliwell B and Gutteridge J (2015).
29. Slade D and Radman M: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75(1), 133 (2011).
30. Rich T, Allen RL, et al.: *Nature* 407(6805), 777 (2000).
31. Daly MJ, Gaidamakova EK, et al.: *PLoS. Biol.* 5(4), 769 (2007).
32. Imlay JA (2008). *Annual Review of Biochemistry*, pp. 755. Palo Alto: Annual Reviews.
33. Daly MJ, Gaidamakova EK, et al.: *Science* 306(5698), 1025 (2004).
34. Bagwell CE, Bhat S, et al.: *PLoS One* 3(12), 16 (2008).
35. Saito T, Terato H, et al.: *Arch. Microbiol.* 162(6), 414 (1994).
36. Tian B, Xu ZJ, et al.: *Biochim. Biophys. Acta-gen. Subj.* 1770(6), 902 (2007).
37. Yoshida K, Hashimoto M, et al.: *Mar. Drugs* 14(5), 23 (2016).
38. Nayak T, De D, et al.: *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 17(3), 1627 (2020).
39. Rahman Z: *J. Hazard. Mater.* 396, 15 (2020).
40. Suhre K and Claverie JM: *J. Biol. Chem.* 278(19), 17198 (2003).
41. Beblo K, Douki T, et al.: *Arch. Microbiol.* 193(11), 797 (2011).
42. Suzuki K, Collins MD, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 52(1 – 2), 33 (1988).

Souhrn

Timkina E., Mařátková O.: Charakteristika minerálních radonových pramenů a jejich mikrobiálního osídlení

Radonové prameny se označují jako prostředí s extrémními podmínkami. Mikrobiom radonových pramenů je v současné době málo prozkoumán, ale jeví se jako společenství se zástupci potenciálně technologicky využitelných mikroorganismů. Mikroorganismy v radonových pramenech jsou často vystaveny společnému působení nejrůznějších nepříznivých podmínek, mezi něž patří vysoká teplota, přítomnost těžkých kovů a ionizující záření. Ionizující záření a další extrémní vnější podmínky vedly k vývoji ochranných mechanismů. Studium mechanismů odolnosti představuje potenciál pro pochopení života v extrémních podmínkách.

Klíčová slova: Radonové prameny, Jáchymov, Ionizující záření, *Deinococcus*, *Actinobacteria*

Summary

Timkina E., Mařátková O.: Characteristics of radon springs and their microbiomes

Radon springs are commonly defined as environments with extreme conditions. The microbiome of radon springs is currently poorly studied, but it appears to be a community of microorganisms with potential for technological applications. Microorganisms in radon waters are exposed to several adverse conditions, including high temperatures, the presence of toxic heavy metals, and ionizing radiation. Ionizing radiation and other extreme external conditions force microorganisms to develop protective mechanisms that reduce cell damage. The study of resistance mechanisms presents the potential for understanding life in extreme conditions.

Keywords: Radon springs, Jáchymov, Ionizing radiation, *Deinococcus*, *Actinobacteria*

BIOLOGICKÁ KONVERZE SYNGASU NA METHAN POMOCÍ SMĚSNÉHO ANAEROBNÍHO KONSORCIA

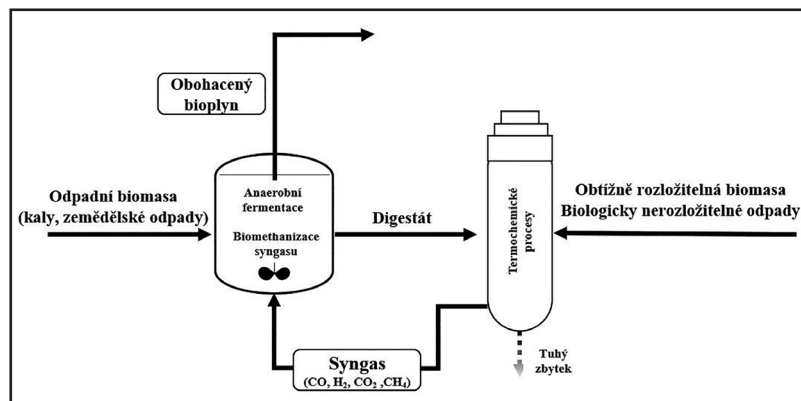
Dominik Andreides, Dana Pokorná, Jana Zábranská

Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav technologie vody a prostředí, Technická 5, 166 28 Praha 6 – Dejvice; andreidd@vscht.cz

Úvod

Anaerobní fermentace je celosvětově rozšířená technologie pro zpracování biologicky rozložitelné odpadní biomasy a jejím hlavním produktem je bioplyn a tuhý

zbytek, tzv. digestát. Bioplyn, jehož majoritní energetickou složkou je methan (CH_4), se nejčastěji využívá ke kombinované výrobě tepelné a elektrické energie, popř. pro výrobu tepla a páry. Digestát obsahuje ještě vysoký podíl obtížně rozložitelných organických látek (40 – 50 %) a je tedy často aplikován na zemědělskou půdu jako hnojivo. Takovéto využití digestátu podléhá řadě legislativních předpisů, které stanovují limitní hodnoty koncentrací rizikových prvků a indikátorových mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že v budoucnu je plánováno zpřísnění těchto limitů, je snaha hledat alternativní metody pro efektivní nakládání s takovým digestátem. Jednou z možností je kombinace termochemických procesů (pyrolýza a zplynňování) a anaerobní fermentace (Obr. 1). Takovéto uspořádání by umožnilo i zpracování širokého spektra obtížně rozložitelné odpadní biomasy s vysokým podílem ligni-



Obr. 1 Schématické znázornění integrace termochemických procesů k anaerobní fermentaci.

nu a celulosy za současné zvýšení produkce bioplynu či CH_4 ¹.

Hlavním produktem zplyňování je syntézní plyn (syngas), jehož majoritními složkami jsou oxid uhelnatý (CO), vodík (H_2), oxid uhlíčitý (CO_2), CH_4 či lehké uhlovodíky (C_xH_y) v proměnlivém zastoupení. Ačkoliv produkovaný syngas lze upravit pomocí katalytické methanizace na CH_4 , tento proces vyžaduje extrémní reakční podmínky a vysoké investiční náklady vzhledem k nutné předúpravě syngasu. V neposlední řadě je během procesu nutné využít katalyzátory, které jsou citlivé na znečišťující polutanty v syngasu².

Výše zmíněné nevýhody mohou být eliminovány biologickou konverzí syngasu na CH_4 přímo v anaerobním fermentoru bez nutnosti investice do dalších dodatečných technologií pro zpracování či předúpravu syngasu. Výsledkem přiřazení termochemických procesů k anaerobní fermentaci může být synergický efekt ekonomické prosperity vlivem zvýšené produkce CH_4 a aplikace principů cirkulární ekonomiky v rámci jednoho provozu. To vše díky vhodnému mikrobiálnímu konsorciu.

Průběh biologické konverze syngasu v anaerobním fermentoru

Syngas přiváděný do anaerobního fermentoru je přeměňován přímo na CH_4 nebo prostřednictvím meziproduktů několika mikrobiálními skupinami, které syntrofně spolupracují – methanogenní *Archaeae*, acetogenní, hydrogenogenní a sulfát-redukující bakterie. Ačkoliv se jedná o poměrně složitý biochemický proces, směsné kultury z anaerobních fermentorů mají vyšší adaptační schopnost, vyšší toleranci vůči nečistotám obsaženým v syngasu nebo i větší odolnost při narušení optimálních provozních podmínek než čisté mikrobiální kultury^{3,4}. Tento aspekt je v komerčním měřítku zásadním parametrem vzhledem k nutnosti udržet proces stabilní. Dílčí, na sebe navazující, biochemické reakce v anaerobní fermentaci jsou všeobecně známy⁵, ale pokud je v systému přítomen CO nebo vyšší koncentrace H_2 , dochází k vytvoření nové strategie.

Klíčovým enzymem pro biokonverzi CO je CO-dehydrogenasa (CODH)^{6,7}. Funkce CODH se však liší na základě mikrobiální skupiny. Buďto může katalyzovat oxidaci CO nebo může katalyzovat syntézu či štěpení acetyl-CoA^{3,7}.

Přímá biokonverze CO na CH_4

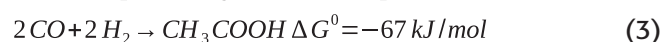
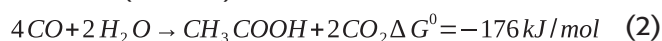
Přímá biologická konverze CO může být docílena pomocí karboxydotrofních methanogenů dle rov. 1⁸. Tyto mikroorganismy jsou běžně přítomné v anaerobní směsné kultuře a vytvořením vhodných podmínek k růstu je lze učinit dominantními methanogeny v daném mikrobiálním konsorciu. Mezi methanogenní mikroorganismy, které jsou schopny využívat CO k přímé produkci CH_4 , patří pouze *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanosarcina acetivorans* strain C2A a *M. barkeri*⁷. Jejich tolerance na maximální parciální tlak CO v systému se pohybuje v rozmezí 20,3 kPa až 50,7 kPa^{3,9}. Nicméně, v laboratorním měřítku existují případy adaptace *M. barkeri* na 100 % atmosféru CO (101 kPa)⁷. Bohužel se karboxydotrofní methanogeny vyznačují velmi dlouhou generační dobou, která je od 24 hodin (*M. acetivorans*) až do 200 ho-

din (*M. thermoautotrophicus*)¹⁰. V praxi to znamená, že k podpoření růstu karboxydotrofních methanogenů ve směsném mikrobiálním konsorciu je nutné provozovat anaerobní fermentor s dlouhou dobou zdržení.

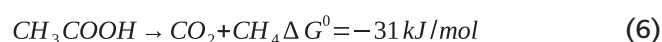
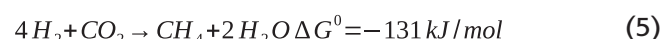
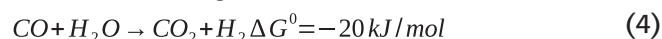


Nepřímá biokonverze CO na prekursor metanogeneze

Nepřímá biologická konverze CO na CH_4 zahrnuje produkci kyseliny octové jakožto meziproduktu CO -acetogeneze (rov. 2) nebo CO -homoacetogeneze (rov. 3). Tyto reakce probíhají především při vysoké koncentraci kyseliny octové v systému a nízké koncentraci H_2 a CO_2 v mezofilním režimu (37 °C) anaerobní fermentace^{8,11}. Acetogenní mikroorganismy (jako např. rod *Moorella* nebo rod *Clostridium*) se vyznačují vysokou tolerancí vůči maximálnímu parciálnímu tlaku CO (> 1 atm)⁷.



V neposlední řadě může být CO využit pomocí karboxydotrofních hydrogenogenních bakterií (rov. 4). Právě produkce H_2 jako meziproduktu je pozorována především v termofilních podmínkách anaerobních fermentorů (55 °C)¹¹. Výše zmíněné meziprodukty jsou posléze využity v závěrečné fázi anaerobní fermentace k produkci CH_4 pomocí hydrogenotrofní (rov. 5) a acetotrofní metanogeneze (rov. 6).



Je nutné podotknout, že lze využít i alternativní přístup biologické konverze syngasu, tj. produkce nižších mastných kyselin (NMK) z CO dle rov. 2 – 3, popř. produkce alkoholů namísto jeho konverze na CH_4 . V biotechnologické aplikaci se to jeví jako perspektivní alternativa, neboť je možné využít jak alkoholy a NMK v kofermentaci s jinými organickými materiály nebo s anaerobní stabilizací čistírenského kalu, tak i dávkovat tyto jednoduché organické substráty do aktivační nádrže jako zdroj externího uhlíku pro dosažení úplné denitrifikace a tím intenzifikovat proces biologického čištění odpadních vod. Dalším alternativním přístupem je produkce bio-vodíku z CO pomocí čistých mikrobiálních kultur¹².

Společné limitující faktory biomethanizace syngasu

Teplota

S rostoucí teplotou sice roste aktivita směsné anaerobní kultury, nicméně klesá rozpustnost plynů v kapalně fázi, tudíž může dojít ke zvýšené koncentraci zbytkového CO či H_2 v produkovaném bioplynu, což může mít negativní efekt při jeho energetické valorizaci. Nicméně, vyšší aktivita mikroorganismů při zvýšené teplotě převažuje nad negativním vlivem rozpustnosti plynů v kapalně fázi¹³. Pozitivním vlivem zvýšené teploty je zároveň až několikanásobné zvýšení růstové rychlosti. Teplota dále ovlivňuje meziprodukty nepřímé biologické konverze CO , jak je popsáno výše. Jako možné vysvětlení se nabízí vyšší diverzita karboxydotrofních hydrogenogen-

ních bakterií v termofilním prostředí nebo vliv zvýšené teploty, při které jsou biochemické reakce produkující H_2 silně exergonické, což zvyšuje hydrogenogenní konverzi CO v termofilním prostředí^{3,14}.

Rychlost přestupu plynné fáze do kapalné

Při dávkování plynů do kapalné fáze je jedním ze základních parametrů rychlost přestupu hmoty. Tento parametr lze pozitivně ovlivnit pomocí rychlosti míchání, typem použitého bioreaktoru, typem distribučního zařízení nebo velikostí recirkulace plynu¹⁵.

Parciální tlak syngasu

Jak již bylo zmíněno, parciální tlak CO výrazně ovlivňuje konečné produkty konsorcia anaerobních mikroorganismů. Sipma a kol. pozorovali při parciálním tlaku CO 156 kPa – 172 kPa konverzi CO na H_2 , ale již nebyl pozorován závěrečný krok methanogeneze¹⁶. Ztráta methanogenní aktivity byla sledována i ve studii Alves a kol., ve které zkoumali vliv parciálního tlaku CO (9 kPa – 88 kPa) na termofilní anaerobní kulturu. Zastavení produkce CH_4 bylo pozorováno při přesáhnutí

parciálního tlaku CO 35 kPa¹⁷. Ztráta methanogenní aktivity může být využívána právě k selekci meziproductů a jejich následnému využití dle stávajících požadavků dané aplikace.

Závěr

Kombinace termochemických procesů s anaerobní fermentací nabízí ideální řešení finálního zpracování digestátu za současné zlepšení energetické bilance zpracování odpadní biomasy. Již vybudovaná infrastruktura anaerobních fermentorů nabízí ideální prostor pro energetickou valorizaci syngasu pomocí směsné anaerobní kultury bez nutnosti dalších investic pro jeho úpravu či využití. Výsledkem je celkové zvýšení účinnosti využití energie z odpadní biomasy s minimální produkcí zbytkových materiálů.

Poděkování

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického výzkumu – projekt č. A2_FT0P_2020_002.

Literatura

1. Feng Q and Lin Y: *Renew Sust Energ Rev* 77(1272) (2017).
2. Aresta M, Dibenedetto A, et al.: *J Catal* 343(2) (2016).
3. Grimalt-Alemany A, Skiadas IV, et al.: *Biofuel Bioprod Bior* 12(1), 139 (2018).
4. Kleerebezem R and Van Loosdrecht MCM: *Curr Opin Biotechnol* 18(3), 207 (2007).
5. Borja R (2011). *Comprehensive Biotechnology*, pp. 785.
6. Oelgeschläger E and Rother M: *Arch Microbiol* 190(3), 257 (2008); Henstra AM, Sipma J, et al.: *Curr Opin Biotechnol* 18(3), 200 (2007).
7. Sipma J, Henstra AM, et al.: *Crit Rev Biotechnol* 26(1), 41 (2006).
8. Sun H, Yang Z, et al.: *Chem Eng J* 126177 (2020).
9. Diender M, Pereira R, et al.: *Front Microbiol* 7(1049), (2016).
10. Rother M and Metcalf WW: *P Natl A Sci USA* 101(48), 16929 (2004).
11. Guiot S, Cimpoea R, et al.: *Environ Sci Technol* 45(2006) (2011).
12. Younesi H, Najafpour G, et al.: *Bioresource Technol* 99(7), 2612 (2008).
13. Pokorna D, Varga Z, et al.: *Renew Energ* 142(167) (2019); Asimakopoulos K, Łęzyk M, et al.: *Chem Eng J* 393(124739) (2020).
14. Conrad R and Wetter B: *Arch Microbiol* 155(1), 94 (1990).
15. Savvas S, Donnelly J, et al.: *Appl Energ* 202(238) (2017); Seifert AH, Rittmann S, et al.: *Bioresource Technol* 136(747) (2013).
16. Sipma J, Lens PN, et al.: *FEMS microbiol ecol* 44(2), 271 (2003).
17. Alves JJ, Stams AJM, et al.: *FEMS microbiol ecol* 86(3), 590 (2013).

Souhrn

Andreides D., Pokorná D., Zábranská J.: Biologická konverze syngasu na methan pomocí směsného anaerobního konsorcia

Termochemické procesy, jako je zplyňování či pyrolýza, jsou považovány za udržitelnou technologii nakládání s odpady, respektive odpadní biomasou. Hlavním produktem zplyňování je syntézní plyn (syngas), který v majoritním zastoupení obsahuje H_2 , CO, CH_4 a CO_2 . Právě CO a H_2 mohou být využity jako redukční ekvivalenty pro biologickou konverzi na CH_4 přímo v anaerobním fermentoru pomocí směsné anaerobní kultury. Ve srovnání s fyzikálně-chemickým procesem katalytické methanizace syngasu poskytuje biologická konverze syngasu zásadní výhody – absence drahých katalyzátorů, mírnější provozní podmínky a vyšší toleranci mikroorganismů vůči nečistotám obsaženým v syngasu. Kombinace termochemických procesů a anaerobní fermentace má velký potenciál, neboť by umožnila jak zpracování digestátu, tak i možnost využít obtížně rozložitelnou odpadní biomasu s vysokým podílem ligninu a celulózy za současné zvýšení produkce bioplynu či CH_4 . Tento článek shrnuje nejdůležitější aspekty pro úspěšnou biologickou konverzi syngasu, včetně metabolických interakcí směsné anaerobní kultury či limitujících faktorů procesu.

Klíčová slova: anaerobní fermentace, bioplyn, biologická konverze, syngas

Summary

Andreides D., Pokorná D., Zábranská J.: Biological conversion of syngas to methane using anaerobic culture

Thermochemical processes (e.g. gasification or pyrolysis) are considered as a sustainable technology for high-solid content waste (including organic waste) conversion into valuable products. The main product of gasification is synthesis gas (syngas) which consists mainly of H_2 , CO, CH_4 and CO_2 , respectively. Therefore, syngas reducing equivalents (H_2 , CO) can be used for the biological conversion to CH_4 directly in the anaerobic fermenter by anaerobic culture. The biological conversion of syngas presents several advantages over its analogous process of catalytic syngas methanation such as the absence of the expensive metal catalysts, milder operational conditions and higher tolerance to the syngas impurities. Moreover, the combination of thermochemical processes and the anaerobic digestion process has great potential, as it provides digestate disposal and the possibility of using waste biomass with a high proportion of lignin and cellulose. As a result, biogas or CH_4 production is increased. The most relevant aspects for the successful biological conversion of syngas are summarized in this article, including metabolic interactions in mixed anaerobic consortia or limiting factors of the process.

Keywords: anaerobic digestion, biogas, biological conversion, syngas

OBSAH

Úvodem	49
Strnádel J., Záhumenská R., Hajdúchová D, Nosál V., Smolár M., Kalman M., Marcinek J., Juhás Š., Juhášová J., Mitrušková B., Studenovská H., Braný D., Meršaková S., Nováková S, Škovierová H., Péčová R., Kurča E., Halašová E.: Indukovaná pluripotencia v <i>in vitro</i> modelování chorôb a v regeneratívnej medicíne	50
Kolek J., Patáková P.: Problematica využití probiotik u psů	53
Timkina E., Mařátková O.: Charakteristika minerálních radonových pramenů a jejich mikrobiálního osídlení	57
Andreides D., Pokorná D., Zábranská J.: Biologická konverze syngasu na methan pomocí směsného anaerobního konsorcia	61

CONTENT

Editorial	49
Strnádel J., Záhumenská R., Hajdúchová D, Nosál V., Smolár M., Kalman M., Marcinek J., Juhás Š., Juhášová J., Mitrušková B., Studenovská H., Braný D., Meršaková S., Nováková S, Škovierová H., Péčová R., Kurča E., Halašová E.: Induced pluripotency for <i>in vitro</i> disease modeling and regenerative medicine	50
Kolek J., Patakova P.: Use of probiotics in dogs	53
Timkina E., Mařátková O.: Characteristics of radon springs and their microbiomes	57
Andreides D., Pokorná D., Zábranská J.: Biological conversion of syngas to methane using anaerobic culture	61

REDAKČNÍ RADA

doc. Ing. Petra Lipovová, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (vedoucí redaktor)
prof. Ing. Jan Káš, DrSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
Ing. Michaela Marková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (redaktor)
doc. RNDr. Petr Skládal, CSc., Ústav biochemie, PřF MU v Brně, Kamenice 753/5, Bohunice, 601 77 Brno (redaktor)
doc. RNDr. Marek Petřivalský, Ph.D., Katedra biochemie, PřF Palackého univerzity, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc (redaktor)
RNDr. Ivan Babůrek, CSc., Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i., Rozvojová 263, 165 02 Praha 6
doc. Ing. Radovan Bílek, CSc., Endokrinologický ústav, Národní 8, 116 94 Praha 1
prof. Ing. Alena Čejková, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc., Katedra biochemie PřF UK, Albertrtov 6, 128 43 Praha 2
RNDr. Milan Fránek, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
prof. Ing. Ladislav Fukal, CSc., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6
Ing. Jan Kopečný, DrSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, v.v.i., Videňská 1083, Praha 4
prof. RNDr. Pavel Peč, CSc., Katedra biochemie, Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
doc. RNDr. Jana Pěkníková, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v.v.i., Průmyslová 59/5, Vestec, 252 42 Jesenice
RNDr. Vladimír Vala, Teva Czech Industries, s.r.o., Ostravská 29, 747 70 Opava – Komárov
doc. RNDr. Petr Zbořil, CSc., Ústav biochemie, PřF MU, Kotlářská 267/2, 611 37 Brno

POKYNY PRO AUTORY

Rukopis musí být opatřen plným jménem autorů, jejich pracovištěm a e-mailovými adresami. Text se předkládá jako soubor MS Word (doc, docx, rtf) ve formátu jednoduchého řádkování písmem fontu Arial o velikosti 11. Rozsah není při dodržení správné publikační praxe omezen.

Článek má tyto části: Název práce, jména autorů a pracoviště, e-mailová adresa autora, úvod, vlastní text členěný do kapitol, závěr, příp. poděkování, citace literatury, český souhrn a klíčová slova a anglický souhrn a klíčová slova. Odkazy na literaturu se číslují v pořadí, v jakém přicházejí v textu a jsou uváděny formou exponentu (bez závorek) v příslušném místě textu (včetně tabulek a obrázků). Zkratky časopisů se používají podle zvyklosti Chemical Abstract Service Source Index.

Příklady citací: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Disertační práce, VŠCHT Praha 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, staženo 3. září 2011.

Tabulky se označují římskými číslicemi. Každá tabulka je opatřena názvem a popisem umístěným nad tabulkou. Obrázky se číslují arabskými číslicemi (příklad formátu **Obr. 1:**). Každý obrázek musí být opatřen legendou, která jej činí jednoznačně srozumitelným (tj. bez nutnosti hledat nezbytné informace v textu). Obrázky nekládejte do textu rukopisu, ale zasílejte je samostatně v některém z běžných formátů např. tif, jpg (rozlišení 300 dpi).

Rukopisy je třeba zaslat e-mailem na adresu jan.kas@vscht.cz nebo na petra.lipovova@vscht.cz. Bližší informace naleznete na <http://bts.vscht.cz>.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The manuscript must be provided with the full name of authors, the institutions name and with e-mail addresses. Text is presented in a MS Word (doc, docx, rtf) format, single line spacing, font Arial, font size 11. The size is not restricted.

The article contains the following sections: title, authors and institutions, e-mail address of the corresponding author, introduction, text divided into chapters, conclusions, references, summary and keywords in English, summary and keywords in Czech. References are numbered according to their appearance in the text and as an exponent (without parentheses) in the appropriate place in the text.

Examples: Horgan AM, Moore JD, Noble JE, et al.: *Trends Biotechnol.* 28, 485 (2010).

Lowestein KA: *Silicones. A Story of Research.* Wiley, New York 2006.

Fujiki M (2008): Helix generation, amplification, switching, and memory of chromophoric polymers.

In: *Amplification of Chirality, Topics in Current Chemistry* 248 (Soai K ed.), Springer, Berlin, 119–201.

Novák Z: Diploma thesis, UCT Prague 2008.

<http://www.fs.fed.us/research/>, downloaded 1st September 2011.

Tables are numbered by Roman numerals. Each table is provided with a name and description placed above the table. Pictures are numbered in Arabic numerals (example format **Fig. 1:**). Each image must be provided with a legend. Pictures should be sent separately in a common format such as tif, jpg (resolution 300 dpi). Manuscripts should be sent to the e-mail address jan.kas@vscht.cz or petra.lipovova@vscht.cz. More information can be found on <http://bts.vscht.cz>.

BIOPROSPECT

Vydavatel:
BIOTECHNOLOGICKÁ SPOLEČNOST
Technická 3
166 28 Praha 6
IČ: 00570397

Zapsán do evidence periodického tisku a bylo mu přiděleno evidenční číslo:
MK ČR E 19409

Zařazen do Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik
vydáváných v ČR

Tiskne:
VENICE Praha, s.r.o.
Za Hanspaulkou 13/875
160 00 Praha 6

ISSN 1210-1737 (Print)
ISSN 2570-8910 (Online) – <http://bts.vscht.cz/bioprospect.html>

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (<http://bts.vscht.cz>)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).