

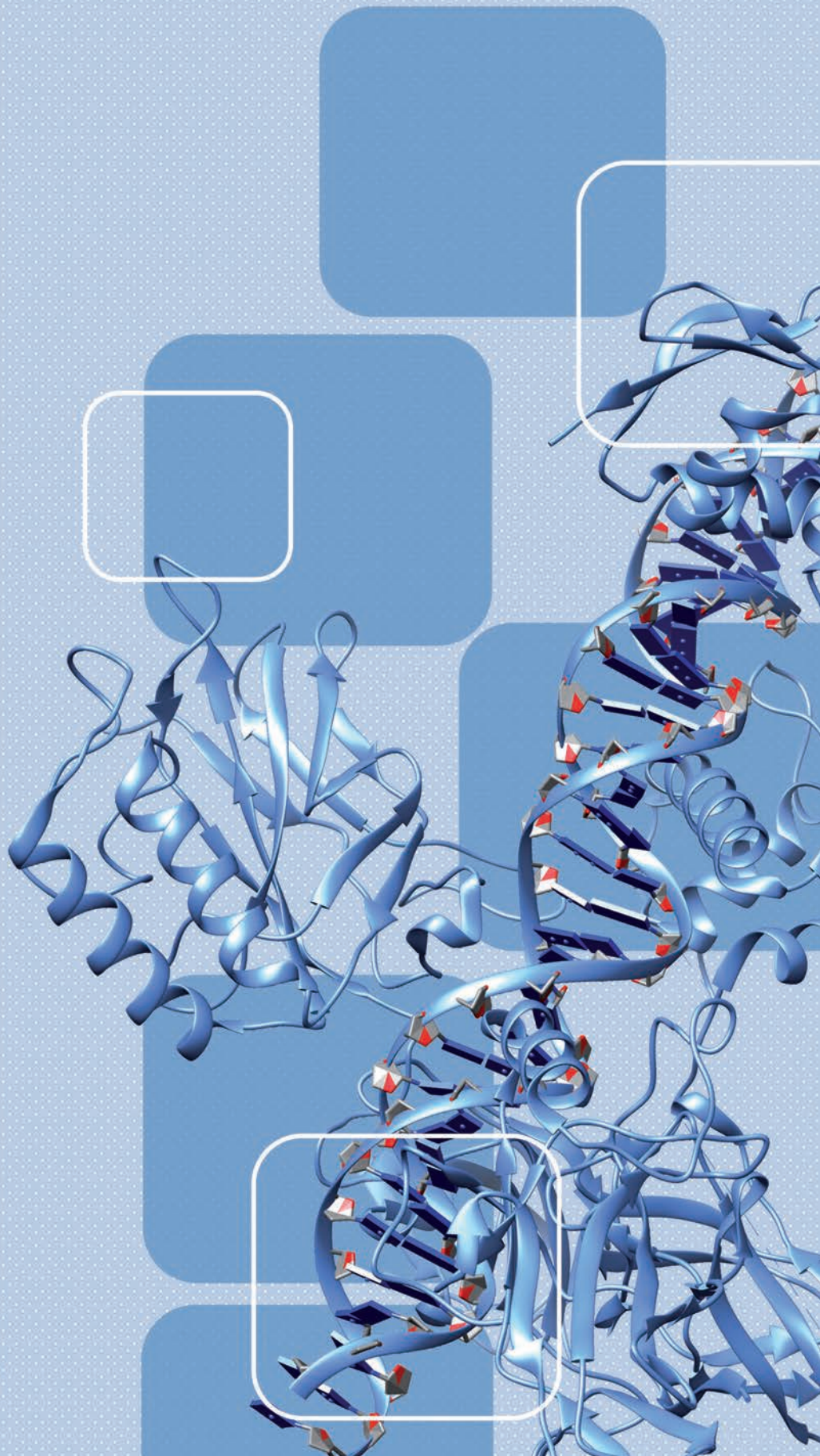
Bio

Ročník 24 • Číslo 4/2014

prospect

**BULLETIN
BIOTECHNOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI**

zakládajícího člena
Českého svazu
vědeckotechnických
společností (ČSVTS)
a
člena „European
Federation
of Biotechnology“
(EFB)



Bio prospect

Society address: Institute of Chemical 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.efb-central.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)

ICT, Technická 3

166 10 Prague 6, Czech Republic

Phone +420 220 443 028

e-mail: petra.lipovova@vscht.cz

ÚVODEM

Vážení přátelé,

blíží se konec kalendářního roku a také doba bilančování naší činnosti v tomto roce. Připomeňme si náš tradiční jarní seminář, který se tentokrát věnoval problematice aplikace metagenomiky v biotechnologiích, pravidelné informování našeho členstva a dalších příznivců e-mailovým servisem i webovými stránkami, novou moderní úpravou vzhledu i zvýšení úrovně našeho časopisu Bioprospect a jeho zařazení do seznamu recenzovaných neimpaktovaných časopisů, naše webové stránky jsou archivovány Národní knihovnou. Zdůrazněme naši úzkou spolupráci s EFB charakterizovanou především činností regionální kanceláře Evropské federace biotechnologií v rámci Centra pro zemědělský a biotechnologický výzkum v Olomouci, aktivní účast prof. RNDr. Ivo Fréborta, CSc. ve vedení EFB (viz <http://www.efb-central.org>), účast na EBC (viz dále publikovaná zpráva) a dalších biotechnologických akcích a spolupráci s naší střešní organizací ČSVTS, kde naše společnost byla zastoupena v dozorčí radě RNDr. Tomášem Vaňkem, CSc. Naší největší a nejnáročnější akcí v tomto roce byla příprava a realizace mezinárodní konference BioTech 2014, spojené s 6. Česko-švýcarským symposiem pořádaná ve dnech 11. – 14. června 2014 v Národní technické knihovně v Praze za účasti 265 delegátů z 32 zemí světa (viz. zpráva publikovaná v Bioprospect 24 (2), 22 – 23, 2014). Na webových stránkách www.biotech2014.cz je k dispozici kniha abstraktů (Book of Abstracts), fotografie z průběhu symposia (Gallery) a mnoho dalších informací. V této souvislosti bychom rádi vyjádřili náš dík všem spoluorganizátorům a zejména našim sponzorům, vystavovatelům i účastníkům, bez jejichž pomoci by takto náročné symposium nemohlo být tak úspěšné.

Tak, jak jsme slíbili, bylo naše letošní třetí číslo věnováno vybraným článkům z této konference. Nicméně ty nejvýznamnější přehledné články různých aktuálních problémů moderních biotechnologií budou publikovány ve speciálním čísle prestižního časopisu *Biotechnology Advances* vydávaného nakladatelstvím Elsevier. V současné době probíhá náročné recenzní řízení článků zaslaných k publikaci ve vyhlášeném termínu. Toto číslo vyjde v příštím roce.

Jistě Vám neunikla zpráva, že Američan James Watson, který v roce 1962 obdržel spolu s Francisem

Crickem a Mauricem Wilkinsem Nobelovu cenu za objev struktury DNA (objev z r. 1953) se ve svých 86 letech rozhodl dát tuto cenu do dražby a výtěžek věnovat univerzitám v Bostonu a Cambridge. Dražba, která proběhla 4. 12. 2014, přinesla výtěžek 4,8 milionů amerických dolarů nebo chcete-li, asi 3 miliony britských liber (viz. <http://www.bbc.com/news/science-environment-3034690>). Na první pohled by se mohlo zdát, že prop dávat tak významné ocenění není zrovna etické, ale fakt, že tímto činem může věhlasný vědec ještě jednou významně prospět rozvoji vědy (sponzorováním získanými prostředky) plně opravňuje tento krok. Watson tak učinil jako první žijící nobelista, a tak získal možnost získané prostředky vynaložit dle své vlastní úvahy. V ostatních případech byla Nobelova cena dávana do dražby až dědici nobelisty. Tak např. Nobelova cena jeho spolunobelisty Francise Cricka byla v r. 2013 vydražena za 2,2 milionu amerických dolarů (Crick zemřel v r. 2004). Watsonova dražba byla mnohem úspěšnější a přinesla vědeckému bádání větší profit.

Závěrem našeho úvodníku bychom, již tradičně, rádi připomněli témata článků, které naleznete v tomto čísle. Přinášíme Vám zde informace o Evropském biotechnologickém kongresu v Edinburgu a o superrozlišovací fluorescenční mikroskopii, za jejíž objev byla udělena Nobelova cena za chemii pro r. 2014. Následují přehledné články o kloubních implantátech, biofilmech, produkci bioethanolu a použití jednobuněčných řas při výrobě bioplynu. Dále pak o problematice PCR a o *Mycobacterium tuberculosis*.

Při bilančování letošního roku si bohužel musíme i připomenout smutné události, které způsobily a dále působí mnoha lidem velké utrpení. Je to expanse teroru do řady zemí Blízkého Východu pod vlajkou tzv. Islamského státu, nešťastná ukrajinská krize, smrt zcela neviných pasažérů malajsijského letadla, nacionalismus a další jevy, které podkopávají mezinárodní spolupráci a spokojený život na této planetě. Přejme si, aby politici v sobě našli odvahu řešit všechny tyto problémy uvážené a s maximální tolerancí.

Všem naším čtenářům přejeme příjemné prožití vánočních svátků a po celý příští rok 2015 pevné zdraví, dobrou náladu a mnoho úspěchů v profesním i soukromém životě.

Se srdečnými pozdravy se těší na pokračující spolupráci a na Vaše příspěvky do Bioprospectu.

Jan Káš a Petra Lipovová



PF 2015

KRÁSNÉ VÁNOCE
A
ÚSPĚŠNÝ NOVÝ ROK

Biotechnologická společnost
a
redakce Bioprospectu

EVROPSKÝ BIOTECHNOLOGICKÝ KONGRES ECB16 V EDINBURGHU

Hlavní město Skotska letos v létě, ve dnech 13 – 16. 7., hostilo Evropský biotechnologický kongres – ECB16, na který se sjelo téměř 800 delegátů ze všech koutů světa. Největší podíl měli zástupci z Velké Británie, Jižní Koreje a Číny, z evropských států se v první desítku co do počtu delegátů umístili například Rakšané, Němci, Češi, Poláci a Španělé. Kongres slavnostně zahájila Dr. Anne Glover, vrchní poradkyně pro vědu předsedy Evropské komise, svou inspirativní přednáškou o tom, že věda a výzkum představují významnou část evropské kultury a že i nadále je třeba vědecké poznatky převádět do praxe v podobě lepšího životního prostředí, kvalitnějšího životního stylu a udržitelného rozvoje. Prof. Jay Keasling z University of California, Berkeley, přednesl první plenární prezentaci zaměřenou na biologickou a chemickou syntetickou výrobu coby základ pro výrobu biopaliv a jiných bio-materiálů, což by mělo v ideálním případě vést k „neutralitě CO₂“.

Zasedání výkonné rady a valná hromada Evropské biotechnologické federace (EFB)

Před samotným zahájením kongresu v sobotu 12. 7. se konalo zasedání výkonné rady EFB, na kterém byly upřesněny organizační detaily týkající se ECB16 a byl přednesen návrh na založení nové sekce zaměřené na rostlinné biotechnologie, ve které by měla důležitou úlohu hrát česká regionální kancelář EFB představovaná Centrem regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum v Olomouci vedená prof. Ivo Frébortem. Na zasedání byli také přítomni zástupci organizačního týmu z polského Krakova, kde se 3. – 6. 7. 2016 bude konat příští kongres ECB17. Na valné hromadě konané v neděli 13. 7. byla z pověření předsedy prof. Jana Káše Biotechnologická společnost České republiky zastoupena prof. Frébortem. V průběhu jednání byli zvoleni členové výkonné rady EFB na další dvouleté období ze zástupců akademické obce – Ervin Balázs, Diethard Mattanovich a Tomasz Twardowski, průmyslu – Tony Hitchcock a regionálních kancelářů – Ivo Frébort, Francesc Gòdia a Pierre Monsan. Byly předneseny a schváleny auditované rozpočty za rok 2012 a 2013 a představen odhad hospodaření pro zbývající část roku 2014.

Rozmanitý vědecký program kongresu

Během necelých čtyř dnů kongresu se v celkem 21 sekcích konalo přes 150 krátkých přednášek jak v podání zvaných, tak vybraných odborníků dle zaslaných abstraktů dostupných zde (https://www.eiseverywhere.com/file_uploads/33016a7facc92910fa52b9c394e5020_ECB16AbstractBook.pdf). Účastníci si mohli vybrat z rozmanité škály témat od syntetické biologie, aplikací metabolického modelování, industriální biotechnologie, bio-katalýzy, aplikací kmenových buněk a genové terapie po bioodpad a bio-rafinerie, nanotechnologie, genové inženýrství rostlin či biomedicínu a vývoj vakcín. Českou republiku reprezentovali tři zástupci – prof. Ivo Frébort z Univerzity Palackého

v Olomouci, doc. Tomáš Cajthaml z Univerzity Karlovy v Praze a Ing. Stanislav Obruča z VUT v Brně. Přednáška prof. Fréborta v sekci, kterou vedl emeritní profesor Marc van Montagu nazvané Genové inženýrství rostlin se týkala geneticky modifikovaných rostlin ječmene, které následně vykazují vyšší odolnost vůči suchu. I ostatní přednášky v této sekci se týkaly možných genetických úprav rostlin tak, aby se daly pěstovat i v nepříznivých klimatických podmínkách a na omezené zemědělské půdě zejména na africkém kontinentě a využít rostliny nejen jako potravu, ale případně i k výrobě léčiv.

Z ostatních sekcí rozhodně stojí za zmínku diskuze o bio-ekonomice založené na přeměně obnovitelných biologických zdrojů na tzv. bioprodukty a bioenergii s cílem omezit závislost na fosilních a neobnovitelných zdrojích a zároveň omezit vliv lidských aktivit na změnu klimatu, kterého se zúčastnili také zástupce OECD James Philp a zástupkyně Evropské komise Eveline Lecog, která informovala o podpoře bio-ekonomiky v programu HORIZON 2020. „Na rozdíl od ekonomiky založené na fosilních palivech bio-ekonomika musí být udržitelná, aby měla šanci na úspěch. EU, USA a další významné země a regiony si v souladu s bio-ekonomikou stanovily politické cíle a vyvinuly strategické plány k jejich dosažení do roku 2020,“ uvedl Alfredo Aguilar, bývalý vedoucí Generálního ředitelství pro výzkum Evropské komise.

Velmi kontroverzní a podnětná byla i debata o zvyšující se rezistenci chorob vůči antibiotikům a o tom, jaké jsou alternativy k tomuto druhu léků do budoucna. O tom, že se jedná o skutečně aktuální a čím dál tím hrozivější problém svědčí i iniciativa britského ministerského předsedy Davida Camerona, který sestavil panel z expertů v oblasti vědy, financí, průmyslu a zdravotnictví, aby sestavili plán na podporu vývoje nových antibiotik. V uplynulých 25 letech se nepodařilo vyvinout žádný nový druh antibiotika, vždy je to jen variace na již objevený lék. Cameron varoval, že pokud se záhy nepodaří přijít s nějakou alternativou, mohla by se medicína znovu ocitnout v „době temna“, kdy na dnes běžně léčitelné choroby budou lidé opět umírat.

Poster session a ocenění

Kromě ústních sdělení bylo prezentováno více než 400 posterů, kde měli zejména mladí vědci z řad studentů příležitost prezentovat své výsledky. Cenu časopisu New Biotechnology za nejlepší poster získala Elisabeth Lobner z University of Natural Resources and Life Sciences ve Vídni, která obdržela roční předplatné časopisu spolu s poukazem na bezplatné publikování v časopise. Vítězem ceny ECB17 se stal Jan Schürmann z Westfälische Wilhelms-Universität v Münsteru, jenž obdržel bezplatnou registraci na příští kongres ECB17, který se uskuteční 3. – 6. 7. 2016 v polském Krakově. Skupina editorů časopisu Biochemical Engineering Journal ve spolupráci s organizátory kongresu ECB16 vyhlásili vítěze pátého ročníku Ceny pro mladého

vědce (Young Investigator Award), kterým se stal Chetan Goudar z americké společnosti Amgen. Ocenění získal za publikaci „A glimpse into the future of mammalian cell culture process development: innovative approaches to impact time to clinic, product quality, and cost of process development and commercial manufacturing“ (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2014.05.1634>).

Spolupráce Evropy a Asie

Na závěr kongresu promluvil Prof. Sang Yup Lee z Korejského institutu pro vědu a technologie (KAIST) o produkci přírodních i syntetických chemikálií, paliv a jiných látek prostřednictvím metabolicky konstruovaných mikroorganismů. „Během kongresu Evropská

biotechnologická federace uzavřela strategické memorandum o spolupráci s Asijskou biotechnologickou federací a naším společným cílem by mělo být nalezení ekonomicky udržitelné alternativy k ropným produktům v co nejkratším časovém horizontu,“ uvedl prezident EFB Marc van Montagu o směru, kterým by se měl biotechnologický výzkum na globální úrovni ubírat.

Ing. Karolina Chvátalová
(karolina.chvatalova@seznam.cz)
Prof. RNDr. Ivo Frébort, CSc., Ph. D.
Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum

OD MIKROSKOPIE K NANOSKOPII

Nobelova cena za chemii pro rok 2014 byla udělena za „objev superrozlišovací fluorescenční mikroskopie“. Držiteli Nobelovy ceny za chemii pro rok 2014 se stali **Eric Betzig** (Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, USA), **Stefan W. Hell** (Max Planck Institut pro Biofyzikální Chemii, Německé centrum pro výzkum rakoviny, Německo) a **William E. Moerner** (Stanfordova Universita, USA).

Mnoho současných znalostí a pochopení biologických procesů vychází z možnosti přímé vizualizace. Ze široké škály zobrazovacích technik je v biologických vědách fluorescenční mikroskopie preferována zejména díky možnosti specifického značení sledovaných molekul a aplikace na živé buňky. V tom spočívá její výhoda oproti elektronové mikroskopii. Nicméně, konvenční fluorescenční mikroskopie byla dosud limitována poměrně nízkým rozlišením. V optimálním případě lze dosáhnout rozlišení cca 200 nm laterálně a 500 nm axiálně v závislosti na vlnové délce. Vzhledem k malé velikosti proteinů a jiných molekul, jež jsou předmětem zájmu, bylo toto rozlišení, omezené difrakčním limitem světla, nedostatečné. V posledních letech byla proto věnována značná pozornost vývoji nových metod, jejichž cílem bylo tuto difrakční bariéru překonat, a umožnit tak fluorescenční mikroskopii na úrovni jednotlivých molekul. To vedlo k objevu bezpočtu průlomových vysokorozlišovacích (superresolution) technik, za které byla Královskou švédskou akademií věd udělena Nobelova cena v oboru chemie.

Díky současnému vývoji ve vysokorozlišovací fluorescenční mikroskopii a pokošení fyzikálního limitu maximálního možného rozlišení postulovaného Ernstem Abbem, již není pozorování malých molekul v živých objektech nemožné. A to zejména díky průkopnické

práci třech letošních laureátů Nobelovy ceny za chemii. Američtí vědci Eric Betzig a William E. Moerner byli oceněni za tzv. „lokalizační mikroskopii“ umožňující zobrazovat jednotlivé molekuly. Metoda je založena na možnosti aktivace fluorescence jen v části populace fluoroforů ve vzorku, který je po dlouhou dobu snímám. Výsledný rekonstruovaný obraz má pak rozlišení v řádech nanometrů. Německý vědec, vášnivý saxofonista a zakladatel firmy Abberior, Stefan W. Hell pak umožnil přechod z mikrosvětla do nanosvětla díky technice založené na stimulované depleci emise (z angl.: stimulated emission depletion, STED). V této metodě je využíváno dvou laserů, jeden pro vybuzení sledovaného fluoroforu, druhý pro depleci jeho emise. Nesmíme ovšem také zapomenout na bohužel předčasně zesnulého pionýra další superrozlišovací techniky: strukturní iluminální mikroskopie, Matse Gustafssona (Janelia Farm Research Campus, Howard Hughes Medical Institute, USA). Nepostradatelný přínos ve vývoji lokalizačních metod měla také Xiaowei Zhuang (Harvardská universita, USA).

Vysokorozlišovací fluorescenční mikroskopie jistě bude podstatným přínosem i pro výzkum na Vysoké škole chemicko-technologické. Umožní nám rozšířit v současné době používané metody konfokální mikroskopie a fluorescenčního zobrazování živých buněk (live imaging) a zaznamenat nejen v současnosti pozorované dynamické procesy v buňce, ale také zachytit sledované pochody na molekulární úrovni. Potvrzení interakce proteinů či jiných molekul zájmu již nebude díky nanometrovému rozlišení nadále problémem.

Silvie Rimpelová, Tomáš Ruml

BIOFILMY

Boháčová Martina, Pazlarová Jarmila

VŠCHT Praha, Ústav biochemie a mikrobiologie; Martina.Bohacova@vscht.cz

Úvod

Biofilmy spolu s polymerními látkami jsou někdy označovány jako města bakterií a látky, matrice, která jednotlivé buňky obklopuje jejich domem.¹ Odhaduje se, že až 98 % bakterií žijících v přirozených podmínkách vytváří biofilmy, které se tak stávají nedílnou součástí přirozených ekosystémů.² Mikroorganismy interagují mezi sebou ale i s prostředím, ve kterém žijí. Existence těchto společenstev nachází uplatnění v bioremediačních procesech, ale také významně zasahuje do biomedicíny a potravinářského průmyslu.³ Produkce polymerních látek může poskytovat mikroorganismům evoluční výhodu oproti mikrobům, jež je neprodukuje.⁴

V literatuře již existuje mnoho definic biofilmu^{5, 6, 7}. Biofilmy jsou konsorcia buněk obklopená sebou vyprodukovanými polymerními látkami (matricí), která jsou přilnutá k biotickému či abiotickému povrchu, jedná se o velmi dynamické systémy se širokou škálou mikroprostředí měnící se v čase, jejich vznik je výsledkem dialogu mezi mikroorganismy samými a jejich prostředím.

Přítomnost extracelulárních polymerních substancí (EPS) na površích v kontaktu s potravinami umožňuje kolonizaci potenciálně nebezpečných patogenů nebo mikroorganismů hniloby a usnadňuje kontaminační proces. Snížená penetrace biocidu do biofilmu, díky přítomnosti matrice, je jedním z faktorů přispívajícím ke zvýšené rezistenci vůči antimikrobiálnímu přípravku, např. rostoucí hydrofilita bakteriálního povrchu vede ke snížené penetraci antimikrobiálního přípravku hydrofobního charakteru.⁸

Tvorba a vývoj biofilmu

Proces tvorby biofilmu začíná přilnutím k povrchu, vznikem mikrokolonií a pokračuje zráním biofilmu a uvolněním buněk. Struktura biofilmu záleží především na povrchu, mikroorganismu, ale i např. na dostupnosti živin a dalších faktorech. Motilita se jeví jako důležitý faktor pro tvorbu biofilmu, např. mutanti *Pseudomonas aeruginosa* s narušenou motilitou netvoří biofilmy.⁹

Povrch je před kolonizací pokryt filmem organických molekul.¹⁰ Tento proces probíhá kontinuálně. Transport molekul je poměrně rychlý a jeho výsledkem je adsorpce. Vlastnosti substrátu jsou ovlivněny přítomností filmu. Snížením hydrofobicity povrchu se substrát nabíje záporně a změní se jeho potenciál.⁸

Přilnutí k povrchu je komplexní proces s řadou rozeznávaných mechanismů. Proces adsorpce spadá pod zákony fyzikální chemie a je ovlivněn především iontovými silami. Proces adheze je specifická interakce charakterizována stereochemickou orientací molekul a jedná se o reverzibilní proces.¹⁰ Primární adsorpce je proces, který se odehrává v měřítku několika nanometrů díky slabým vazebným interakcím s nízkou spe-

cifitou jako Van der Waalsovy síly.¹¹ Ireverzibilní adsorpce, adherence, je specifická interakce vodíkových můstků, iontových vazeb, hydrofobních interakcí a dipólů odehrávající se v rozmezí 5 nm. Tato vazba vzniká díky sekreci EPS nebo přítomnosti fibrilárních struktur. Množství nevratně adsorbovaných buněk roste s počtem dělicích se buněk. Proces je limitován fyziologickými procesy a koncentrací nutrientů. Přisednutím buněk k povrchu dochází ke změně exprese některých genů a produkci EPS.¹²

Během adherence bakterie používají transportní mechanismy související s prouděním na fázovém rozhraní jako laminární proudění ve vztahu k sedimentaci, motilitě a molekulární difuzi nebo turbulentní proudění k transportu větších částic jako konvekci a difuzi. Mikroorganismy se také mohou aktivně pohybovat skrz „difuzní podvrstvu“ pomocí bičíku nebo pili. Mikroorganismy přilnou na částici reverzibilně nebo ireverzibilně.

Raná kolonizace je zprostředkována specifickými či nesespecifickými iontovými interakcemi povrchu pokrytého filmem s dalšími složkami matrice. Mechanismy adsorpce vedou k akumulaci buněk, následuje dělení a fáze uvolnění buňky z biofilmu a navrácení k planktonní formě růstu. Uvolnění je aktivní či pasivní proces vedoucí k přežití populace nebo kolonizaci a je ovlivněno řadou environmentálních faktorů.

Polymikrobiální biofilmy jsou funkční konsorcia, která často disponují kombinovanou metabolickou aktivitou, rozmanitější než u jednodruhových biofilmů. Pozdní kolonizátoři jsou schopni rozpoznat odlišný genetický stav populace.¹³ Přilnutí geneticky rozdílných bakterií skrze specifické molekuly je označováno jako koagregace.¹⁴

Vyčerpáním nutrientů a energie nutné k zachování metabolických procesů dochází k degradaci biofilmu. Hladovění může vést, až k vnitřnímu rozložení systému, jelikož intracelulární komponenty jsou využívány místo exogenních nutrientů. Když jsou poslední zásoby energie spotřebovány, biofilm zaniká.^{5, 15}

Matrice extracelulárních polymerních látek

Jedním z hlavních strukturních komponent biofilmu je matrice, která se skládá z extracelulárních polymerních látek, mezi něž patří polysacharidy, proteiny a nukleové kyseliny.^{1, 16} Matrice je produkována buňkami samotnými, ale i další struktury bakteriální stěny přispívají k jejím celkovým vlastnostem např. fimbrii, pili a povrchové proteiny.¹⁶ Její vlastnosti ovlivňují porozitu, denzitu, náboj, sorpci, hydrofobicitu, mechanickou stabilitu a proto vytváří podmínky, v nichž buňka žije.¹

Produkce EPS planktonními a přisedlými buňkami hraje důležitou roli v procesu adheze a údržby. Matrice chrání organismus proti vysušení, oxidačním činidlům, antibiotikům a ultrafialovému záření. Vnější vrstvy absorbují poškození a vnitřní mají potom více času

na odpověď vůči stresu.¹⁷ Dynamické prostředí matrice vytváří zóny s pozmeněnou aktivitou. Organizace matrice umožňuje vznik nutričních a osmotických gradientů. Tyto procesy vedou ke stratifikaci a diverzifikaci mikrobiálních buněk a vzniku různých mikroprostředí.^{18, 19} Takovéto uspořádání vylepšuje bakteriální obranné mechanismy. Kmeny produkující EPS, zvláště nízkomolekulární, mohou mít evoluční výhodou oproti kmenům, jež tolik EPS neprodukují. Buňky produkující matici totiž utlumují sousedící buňky matici neprodukující, na druhé straně se ovšem chovají altruisticky k buňkám nad nimi a posouvají je ke zdroji živin, kyslíku nebo mimo zvýšenou koncentraci toxických látek.⁴

Vlastnosti EPS se mění v závislosti na vnitřních a vnějších faktorech. Mezi vnitřní faktory patří genetický „make up“, vnější reprezentuje fyzikálně-chemické prostředí.¹⁶ EPS přirozeně obsahuje buňkami sekretované molekuly a také absorbované živiny, ale většina látek je těžce biodegradovatelná.¹⁷ Ačkoli je větší část EPS často nevyužitelná pro buňku, různé komponenty mohou sloužit jako rozpouštědlo, ty pak snadno interagují s bakteriální kapsulou díky fyzikálně-chemickým vlastnostem např. viskozitě. Velmi důležitou schopností matrice je vázání živin z prostředí.¹⁶

EPS se vytváří během specifické adheze. Matrice umožní následnou kolonizaci a hraje důležitou roli ve vývoji architektury biofilmu do zralého stavu. EPS zesílí interakce mezi mikroorganismy, zapříčiní ireverzibilní adhezi a umožní vznik buněčných agregátů. Matrice je produkovaná během celého cyklu tvorby biofilmu, ale pravděpodobně se největší množství tvoří během maturationí fáze.¹⁸

Nukleové kyseliny

Ačkoli je extracelulární DNA (eDNA) široce studovanou molekulou ve vztahu k biofilmům, její důležitost byla rozpoznána až v posledním desetiletí, tedy celkem nedávno.⁶ eDNA je ubikvitní složkou prostředí a její přítomnost je spojována s buněčnou smrtí, autolýzí, ale i sekrecí. eDNA poskytuje důležitý zdroj živin v ekosystémech, ve smyslu rezervoáru dusíku a fosforu.²⁰ Její prevalence poskytuje volnou DNA a matrice vytváří prostředí s vysokou frekvencí horizontálního genetického transferu.^{11, 21} eDNA je také důležitým přírodním lepidlem významně se účastnící procesu adheze a koagrace.¹⁷

Velikost makromolekul je menší než velikost buněčných struktur, proto musí buňky překonat repulzní síly (odpudivé). Přítomnost eDNA potom přispívá k ireverzibilní adhezi.¹¹ Navíc acid-base interakce (kyselina-zásada) probíhají v stereochemickém mikroprostředí a jejich výsledkem je velmi silná interakce mezi makromolekulami a polárními komponenty buněčné stěny.²²

Původ eDNA je nejistý. Některé studie naznačují, že eDNA je původem genomová nebo jí alespoň velmi podobná.^{11, 23} Jiní autoři uvádějí, že původ eDNA není tolik důležitý, protože každá eDNA bude fungovat jako jakákoli jiná DNA v prostředí.²⁴ eDNA z eukaryotních systémů zahušťuje hlen a vytváří lepivější prostředí u pacientů trpících s cystickou fibrózou. eDNA je také hlavní složkou biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*, známého patogena těchto pacientů. eDNA vykazuje spe-

cifickou prostorovou distribuci ve vztahu ke stáří biofilmu. Množství eDNA se liší dokonce i u blízce příbuzných druhů mikroorganismů např. *S. aureus* produkuje více eDNA než *S. epidermidis*.²⁵

Produkce autolysinů je regulována procesem quorum sensing. Autolysin spouští uvolnění eDNA v biofilmech *Streptococcus* na rozdíl od mutantů, kteří tuto schopnost ztratili. Autolysin (AltE) spouští autolýzu subpopulace *S. epidermidis*.²⁶ Zatím nebylo vyloučeno, že eDNA může být sekretována pomocí vezikulů.¹⁷ Schopnost přilnout ke sklu, polystyrenu a nerezové oceli se zhoršila u mutantů *L. monocytogenes argA, argD*. ArgD je předpokládaným prekurzorem účastnícím se produkce autoindukovaných peptidů nutných pro tvorbu biofilmu, ale přímé důkazy o propojení s quorum sensing zatím chybí.²⁷

Proteiny

Proteiny jsou velmi abundantní složkou EPS a v některých případech mohou přesáhnout i obsah sacharidů např. v biofilmech aktivovaného kalu a kanálů.¹⁷ Mimobuněčně sekretované proteiny mají většinou molekulární hmotnost 10 kDa – 200 kDa, 40 – 60 % proteinů je hydrofóbního charakteru.⁸ Polypeptidy jsou častější u gramnegativních druhů.

Proteiny matrice propojují povrch bakterie a zbytků EPS, tyto proteiny, jsou často schopny vázat cukry a tvořit síť. BapL jsou peptidoglykany vázající protein *L. monocytogenes*, též známý jako Lmo0345, důležitý v tvorbě biofilmu. Knock out mutanti vykazovali sníženou schopnost adheze k povrchu. The BapL je přítomen v mnoha environmentálních izolátech, ale není esenciální pro virulenci v myši na rozdíl od dalších Bap proteinů.²⁸ BapL je analogem dalších s povrchem asociovaných povrchových proteinů produkovaných několika bakteriálními druhy včetně *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Salmonella enterica*.²⁹

Analýza exoproteomů planktonních a biofilmových buněk *L. monocytogenes* EGDe odhalila rozdíly v 31 proteinech, ale pouze 9 jich bylo úspěšně identifikováno.³⁰ Další proteiny jsou často enzymy účastnící se degradace biopolymerů. Z biopolymerů následně vznikají nízkomolekulární látky, které jsou využívány jako zdroj uhlíku a energie. Substrátem bývají ve vodě rozpustné (cukry, nukleové kyselina a protein) nebo ve vodě nerozpustné molekuly (lipidy, celulóza). Další skupina enzymů se účastní uvolnění některých částí EPS. EPS degradující enzymy jsou aktivní především během hladovění. Tyto enzymy jsou schopny využívat také EPS jiných bakterií. Obecně mají tuto schopnost hydrolázy a lyázy, které pomalu rozkládají exopolysacharidy.¹⁹

Některé enzymy jsou virulenními faktory účastnící se infekce.¹⁷ Streptokoky produkují enzymy s přímou či nepřímou imunomodulační funkcí, ovlivňují např. imunoglobuliny nebo faktory komplementu.³¹ Enzymy jsou také využívány v čistíčkách vod, pro purifikaci, hrají důležitou roli v biodegradaci syntetických polymerů a přirozeně způsobují korozi.³²

Sacharidy

Exopolysacharidy se zdají být nejzastoupenější složkou mnoha bakteriálních biofilmů. Sacharidy jsou často

dlouhé lineární nebo větvené sítě o velikosti v jednotkách miliónů Daltonů.¹⁹ Heteropolysacharidy a homopolysacharidy jsou strukturální oporou matrice. Polysacharidy matrice jsou často nerozpustné se schopností vázat pozitivně nabitě molekuly jako soli a kovy. Většina matrice je často složená z neutrálních cukrů jako hexóza či uronové kyseliny. Substituenty bývají estery kyseliny octové, pyruvát, formiát, sukcinát.⁸

Deriváty glukánů a fruktanů jsou produkovány v ústních biofilmech streptokoků. Celulózu tvoří několik druhů bakterií *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp. nebo *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonaceae*.³³ Heteropolysacharidy se skládají z koktejlu nabitých a nenabitých reziduí, které obsahují škálu organických a anorganických substituentů ovlivňující jejich fyzikální a biologickou aktivitu.

Literatura

1. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ: *J. Bacteriol.* 189, 7945 (2007).
2. Dalton HM, March PE: *Curr Opin Biotechnol.* 9, 252 (1998).
3. Kokare CR, Chakraborty S, Khopade AN, et al.: *Indian J. Biotechnol.* 8, 159 (2009).
4. Xavier JB, Foster KR: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104, 876 (2007).
5. Costerton JW: *Int. J. Antimicrob. Agents.* 11, 217 (1999).
6. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, et al.: *Science (New York, N. Y.)* 295, 1487 (2002).
7. Donelli G, Bayston R, Costerton WB, et al.: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 223 (2010).
8. Czaczyk K, Myszkka K: *Polish J. Environ. Stud.* 16, 799 (2007).
9. O'Toole GA, Kolter R: *Mol. Microbiol.* 30, 295 (1998).
10. Dunne WM: *Clin Microbiol Rev.* 15 (2002).
11. Okshevsky M, Meyer RL: *Crit Rev Microbiol.* 1 (2013).
12. Rumbo-Feal S, Gomez MJ, Gayoso C, et al.: *PLoS One.* 8, e72968 (2013).
13. Rendueles O, Ghigo JM: *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 972 (2012).
14. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, et al.: *Trends Microbiol.* 11, 94 (2003).
15. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP: *Science* 284, 1318 (1999).
16. Sutherland IW: *Trends Microbiol.* 9, 222 (2001).
17. Flemming HC, Wingender J: *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623 (2010).
18. Smirnova TA, Didenko LV, Azizbekyan RR, et al.: *Microbiol.* 79, 413 (2010).
19. Sutherland I: *Microbiol.* 147, 3 (2001).
20. Dell'Anno A, Danovaro R: *Science* 309, 2179 (2005).
21. Montanaro L, Poggi A, Visai L, et al.: *Int. J. Artif. Organs.* 34, 824 (2011).
22. Das T, Krom BP, van der Mei HC, et al.: *Soft. Matter.* 7, 2927 (2011).
23. Bockelmann U, Janke A, Kuhn R, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 262, 31 (2006).
24. Steinberger RE, Holden PA: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5404 (2005).
25. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 470 (2008).
26. Qin Z, Ou Y, Yang L, et al.: *Microbiol.* 153, 2083 (2007).
27. Garmyn D, Gal L, Lemaitre JP, et al.: *Commun. Integr. Biol.* 2, 371 (2009).
28. Jordan SJ, Perni S, Glenn S, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5451 (2008).
29. Cuarella C, Solano C, Valle J, et al.: *J. Bacteriol.* 183, 2888 (2001).
30. Tremoulet F, Duche O, Namane A, et al.: *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 25 (2002).
31. Collin M, Olsen A: *Infect. Immun.* 71, 2983 (2003).
32. Shimao M: *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 242 (2001).
33. Zogaj X, Nitz M, Rohde M, et al.: *Mol. Microbiol.* 39, 1452 (2001).

Souhrn

Boháčová M., Pazlarová J.: Biofilmy

Biofilmy obklopené extracelulárními polymerními látkami představují jeden z nejčastěji objevujících se fenotypů v přírodě. Biofilmy jsou proto nedílnou součástí přirozených ekosystémů. Mikroorganismy interagují mezi sebou ale i s prostředím, ve kterém žijí. Přítomnost extracelulárních polymerních substancí na povrchu v kontaktu s jídlem umožňuje kolonizaci potenciálně nebezpečných patogenů nebo mikroorganismů hniloby a usnadňuje kontaminační proces. Hlubší poznání jednotlivých složek matrice může podpořit rozvoj strategií umožňujících účinné rozrušení a odstranění biofilmu. Tento článek je věnován především představení složek matrice a jejich základním funkcím.

Klíčová slova: biofilmy, matrice, extracelulární polymerní látky

Lipidy

Lipidy tvoří minoritní část bakteriální matrice několika druhů. Většina částí matrice je hydrofilní. Hydrofóbními složkami jsou lipopolysacharidy nebo polysacharidy spojené acetylovými a metylovými skupinami¹⁷.

Závěr

Hlubší poznání biofilmů a jednotlivých složek matrice může podpořit rozvoj strategií umožňujících účinné rozrušení a odstranění biofilmu z klinicky a potravinářsky významných povrchů. Bližší studium komunikace a interakcí probíhající v matrici může odhalit nové možnosti pro cílenou terapii.

Poděkování: Financováno z projektu GAČR 14 – 23597-S.

Summary

Boháčová M., Pazlarová J.: Biofilms

Biofilms encased by extracellular polymeric substances are very common phenotype across the nature. Therefore they are inseparable part of natural habitats. Microorganisms interact with each other and also with environment they live in. Presence of extracellular polymeric substances on the surface facilitates colonisation of potentially dangerous pathogens or food spoilage. Better understanding of matrix components can support the development of treatment strategies that successfully disrupt biofilm structure. This article aims to characterise the matrix components and their basic functions.

Keywords: biofilms, matrix, extracellular polymeric substances

PROBLEMATIKA INFEKČÍ KLOUBNÍCH IMPLANTÁTŮ

Eva Kvasničková

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze; kvasnice@vscht.cz

Úvod

Umělé klouby pomáhají každý rok zkvalitnit život milionu lidí po celém světě. Úspěšná implantace kloubní náhrady poskytuje pacientům úlevu od bolesti, obnovuje funkčnost končetin a vrací lidem zpět jejich nezávislost. Například v USA bylo v roce 2010 implantováno 332 000 umělých kyčelních kloubů a 719 000 kolených kloubů. Předpokládá se, že do roku 2030 tato čísla dosáhnou řádu milionů¹.

Bohužel, infekce implantátů jsou v současné době velmi vážnou komplikací. Porézní povlaky na povrchu implantátů, které usnadňují osteointegraci (přímé strukturální a funkční spojení živé kosti s umělým implantátem), vytváří až o 700 % větší plochu ve srovnání s ideální rovinou a tím extrémně zvyšují náchylnost k bakteriální kolonizaci a následné tvorbě biofilmu. A právě zmíněná tvorba biofilmu je příčinou většiny infekcí kloubních náhrad, se kterými se v dnešní době potýkáme².

Biofilm

Schopnost mikroorganismů cíleně regulovat adhezi v závislosti na fyziologickém stavu je jedním z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje rovnováhu mezi planktonickou formou buňky a tvorbou biofilmu³. Biofilmem je mikrobiální společenství uzavřené v biopolymerní matrix, přichycené k povrchu, nebo k sobě navzájem. Mikroorganismy ve formě biofilmů často kontaminují biomedicínská a průmyslová zařízení a způsobují okolo 60 % nozokomiálních infekcí (vzniklých v souvislosti s hospitalizací pacienta), jako jsou například infekce protéz či katetrů. Biofilmové infekce zpomalují hojení ran a často vedou až k opětovné hospitalizaci pacienta. Z tohoto důvodu získala prevence či eradikace biofilmů v posledních deseti letech zvláštní pozornost mnoha vědeckých skupin⁴.

Mikroorganismy způsobující infekce

Mezi nejběžnější bakterie způsobující infekce kloubních implantátů patří: koagulasa-negativní stafylokoky (30 – 43 %), *Staphylococcus aureus* (12 – 23 %), zástupci streptokoků (9 – 10 %), především *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, méně často *Streptococcus pneumoniae*. Dále zástupci enterokoků (3 – 7 %), gramnegativních bacilů (3 – 6 %), například *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* a anaerobních bakterií (2 – 4 %), například *Clostri-*

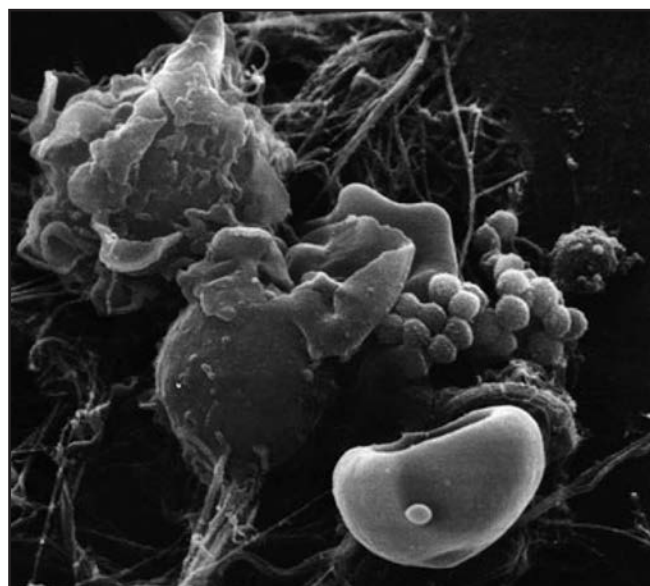
dium spp., *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus* spp. a *Actinomyces* spp.^{1,5,6}. Jako zástupce mycobakterií lze jmenovat *Mycobacterium tuberculosis*. Méně než 1 % infekcí je způsobeno zástupci z řad kvasinek a plísní. Nejčastěji izolovanými kvasinkami (80 % případů) jsou *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*⁷. Z infikovaných materiálů byly také izolovány zástupci plísní *Aspergillus* spp.¹, například *Aspergillus fumigatus*³. Polymikrobiální infekce, způsobené vícedruhovými biofilmy, jsou pozorovány u zhruba 10 – 11 % případů infekcí kloubních náhrad⁷.

Klasifikace infekcí

Klasifikace infekcí kloubních náhrad je rozdělována podle mechanismu jejich vzniku či podle doby, za kterou se infekce projeví po implantaci⁸.

Podle mechanismu vzniku

Mikroorganismy se dostávají do místa infekce buď exogenně (z vnějšího prostředí), nebo hematogenně (krevním řečištěm)⁸.



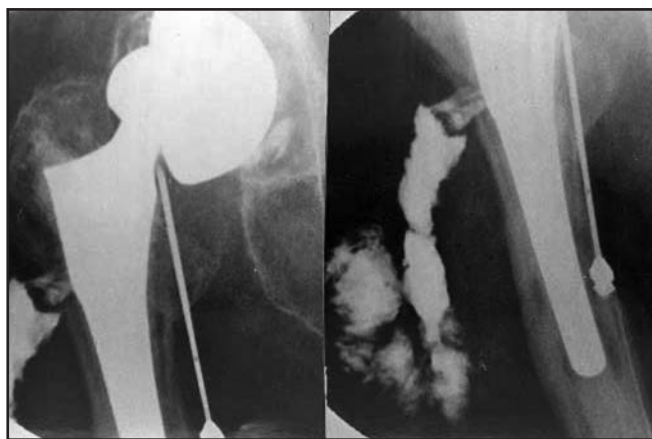
Obr. 1: Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) experimentálně infikovaného implantátu v těle morčete. Po zahojení rány po implantaci uměle infikovaného teflonového implantátu *S. aureus* – na obrázku jsou vidět dva granulocyty, které zjevně nejsou schopny eliminovat buňky *S. aureus*, který je ve formě agregátů přichycen na povrch implantátu – nepravidelný povrch znázorňuje přítomnost exopolysacharidů¹⁰.

K exogenním infekcím často dochází během samotného chirurgického zákroku nebo brzy po operaci v případě špatného hojení operační rány. Tento problém je pozorován především u pacientů s velkými hematomy. Vzácně dochází k exogenní infekci později po zákroku při provádění arthrocentézy (odběr synovialní tekutiny z kloubního pouzdra pomocí injekční stříkačky) za účelem diagnostiky synovialní infekce nebo po spontánním či traumatickém průchodu implantátu skrz pokožku. Tento druh patogeneze je pozorován především u osteosyntézy (fixace komplikovaných zlomenin hřebí a dlahami přímo na kost nebo vnější metodou skrz kůži), méně často pak v případě kloubních náhrad⁹.

K hematogenní infekci dochází přes krevní řečiště kdykoliv po provedení chirurgického zákroku. Bylo prokázáno, že přítomnost cizího tělesa lokálně oslabuje obranu hostitele. Granulocyty, které se hromadí okolo implantátu, nejsou zcela funkční (Obr. 1), pravděpodobně v důsledku poruchy fagocytózy, což vede k degranulaci, poškození pohlcování částic a produkci superoxidu. S ohledem na takto sníženou obranyschopnost je kolonizace implantátu mikroorganismy a následná infekce zcela pochopitelná¹⁰.

Podle doby vzniku infekce od implantace

Nejčastěji je infekce klasifikována podle doby, která uplyne od implantace do prvních příznaků infekce. Používá se označení časná, zpožděná a pozdní infekce. Časná infekce se objevuje během prvních dvou měsíců po chirurgickém zákroku, zpožděná infekce mezi třetím a dvacátým čtvrtým měsícem po implantaci a pozdní déle než po dvou letech od operace¹¹.



Obr. 2: Arthrografie (rentgenové kontrastní vyšetření kloubu) náhrady kyčelního kloubu 5 let po operaci. Pozdní infekce způsobená *S. aureus*¹⁴.

Časná a zpožděná infekce bývají zpravidla exogenní a způsobují je především virulentní mikroorganismy, jako jsou *Staphylococcus aureus* či *Escherichia coli*. Oproti tomu k pozdním infekcím (Obr. 2) obvykle dochází po uplynutí pooperačního období bez příznaků infekce a vznikají hematogenní cestou. Bývají způsobeny mikroorganismy s nízkou virulencí, jako jsou některé druhy staphylokoků nebo například *Propionibacterium acnes*. Nejčastěji dochází k infekci pokožky a měkkých tkání v okolí implantátu. Tyto infekce mohou vzni-

kat přechodem z močového ústrojí, dýchacího ústrojí, gastrointestinálního traktu či ústní dutiny¹¹. Často není možné identifikovat primární ohnisko infekce, protože ve chvíli kdy dochází k lokálním příznakům infekce, je původní zdroj již zahojený. Nejčastěji způsobuje hematogenní infekce implantátů bakterie *Staphylococcus aureus*¹³.

Klinické projevy infekcí

Klinické projevy se liší v závislosti na virulenci infikujícího mikroorganismu, na mechanismu vzniku infekce, na imunitní odpovědi pacienta, na struktuře okolní měkké tkáně a míře poškození kloubního implantátu. Nicméně obecně pozorovanými symptomy jsou bolest v místě zasažení, otok kloubů, hnisavý výtok, zarudnutí a ohřev pokožky v okolí infekce, zimnice s horečkou¹.

Diagnóza

Diagnóza infekcí kloubních náhrad je založena na kombinaci klinických nálezů, laboratorních výsledků získaných z odběru synovialní tekutiny a periferní krve, mikrobiologických dat, histologického hodnocení periprostetické tkáně, předoperační kontroly a v některých případech rtg snímků. Obecný přístup k diagnóze těchto infekcí musí být ze dvou hledisek. Nejprve je nutné zjistit, zda je kloubní implantát skutečně infikován a v případě kladné odpovědi musí být identifikován mikroorganismus, který infekci způsobuje, nakonec musí být stanovena jeho antimikrobiální stabilita. Na základě těchto zjištění je následně navržen léčebný postup¹.

Boj proti infekci

Jelikož mikroorganismy v biofilmu obecně velmi snadno vytváří rezistenci vůči tradičním antibiotikům, není možné léčit infekci kloubních náhrad pouhým podáváním léků. V současné době vyžaduje úspěšná léčba infekcí kloubních náhrad chirurgický zákrok v kombinaci s dlouhodobou antimikrobiální léčbou zaměřenou proti adhezi buněk na povrch implantátu⁷. Optimální antimikrobiální léčba bez chirurgického zákroku není doposud známa¹.

Existují dvě možnosti antibiofilmových strategií. První z nich je preventivní – zabránění mikrobiální adheze na příslušný materiál a tím i předjetí tvorby samotného biofilmu. Druhou možností je eradikace již vytvořeného mikrobiálního biofilmu.

Prevence vzniku infekcí

Identifikace a optimalizace všech ovlivnitelných rizikových faktorů před samotným vložení kloubního implantátu do těla pacienta jsou zásadní pro prevenci vzniku infekce. Mezi tyto faktory patří v případě diabetiků kontrola hladiny glukosy v krvi, u kuřáků podpora odvykání kouření, diagnostika jakékoliv stávající infekce v těle pacienta, apod¹. Dobrou prevencí je poctivě a pravidelně čištění pracovních nástrojů, rukou a veškerého vybavení; ovšem dezinfekční prostředky mohou být toxické a navíc jejich velká spotřeba značně zvyšuje náklady celého procesu. Bylo prokázáno, že použití měděných nástrojů snižuje mnohonásobně riziko kontaminace. Měď je všeobecně známa svými

antibakteriálními vlastnostmi⁴. Při započetí samotného chirurgického zákroku by měla být poctivě vydezinfikována pokožka v místě operačního zásahu. Velký význam má také provedení předoperační antimikrobiální profylaxe pro předejití případné infekce (často bývá používáno antibiotikum cefazolin či vankomycin)¹.

Prevence tvorby biofilmu na samotné kloubní náhradě spočívá buď v totálním předejití či redukci jeho vzniku použitím antiadhezivního či antimikrobiálního povrchu. Tím se buď zabrání ulpívání bakterií na povrchu, nebo jsou zničeny veškeré buňky, které vstoupí do kontaktu s povrchem. V případě přípravy antiadhezivních materiálů lze upravovat drsnost povrchu pomocí fyzikální modifikace¹⁵, změnou povrchové energie¹⁶ nebo imobilizací antiadhezivních látek jako jsou poly(ethylen-glykol) nebo polysacharidy^{17,18}. Pro tvorbu biocidního povrchu lze použít imobilizaci antibiotik inkorporací či kovalentní vazbou přímo k povrchu¹⁹. Často je také používán kvartérní dusík²⁰ či stříbro²¹.

Léčba infikovaného materiálu

Eradikace biofilmu je obtížná, protože přisedlé mikroorganismy jsou výrazně odolnější vůči antibiotikům (oproti planktonickým buňkám až 1000x), biocidům a hydrodynamickým střízným silám. Zvyšováním koncentrace antibiotik dochází postupně k multirezistenci mikroorganismů a neprospívá to životnímu prostředí. Je možné odstraňovat biofilm mechanicky třením, což ale může být pro pacienta velmi bolestivé nebo enzymaticky například použitím enzymu dispersinu B²². Celkově je ale lepší rozvíjet preventivní techniky, než odstraňovat již vzniklou infekci⁴.

Navrhované řešení

Přírodní produkty jsou velmi slibné pro působení proti biofilmu, protože vykazují širokou škálu antimikrobiálního působení při nízkých koncentracích a nepodporují vznik bakteriální rezistence⁴. Mohou mít vliv na různé fyziologické a morfologické vlastnosti buněk a na fyzikálně chemické vlastnosti buněčných struktur včetně EPS matrix (extracelulární polymerní substance). Díky tomu mohou ovlivňovat vznik nebo i zničení

již vytvořeného biofilmu. Vhodné přírodní produkty byly nalezeny především u mikroorganismů a rostlin²³.

Byla publikována řada látek izolovaných z rostlin (polyfenoly, terpenické látky a další), které potlačují mikrobiální adhezi⁷. Další zajímavou možností je použití inhibitorů quorum sensing (QS) (složitý proces umožňující komunikaci mezi buňkami, zprostředkovávaný malými molekulami – autoinduktory, vylučovanými samotnými mikroorganismy). Inhibitory QS jsou v podstatě založeny na přerušení komunikace mezi mikroorganismy, například genovou manipulací nebo použitím konkurenčních molekul, které se naváží na receptory místo autoinduktorů⁴. Mnoho polyfenolů izolovaných ze zeleného čaje nebo ovoce, jako jsou brusinky, maliny, ostružiny a jahody jsou antagonisty acetylovaných homoserinových laktonů (třída signálních molekul zapojených do bakteriálních quorum sensing) v mikroorganismech. Také kofein byl zjištěn jako inhibitor quorum sensing. Dalšími přírodními látkami potlačujícími biofilmové infekce jsou například některé flavonoidy (například naringenin, kaempferol, kvercetin, apigenin), běžně používané koření (vanilin, kurkumin, kapsaicin), terpenové sloučeniny (boswelová kyselina) a ursany (pentacyklické triterpeny)²³.

Závěr

Infekce kloubních implantátů jsou v současné době obrovským a pečlivě studovaným problémem. Nad zabráněním jejich vzniku a způsobem léčby bez nutnosti dalšího chirurgického zákroku stále visí veliký otazník. Nadějně vypadajícím řešením je příprava modifikovaných povrchů materiálů samotných kloubních náhrad. Dále podávání přírodních látek pacientům, které nezpůsobují u mikroorganismů vznik rezistence nebo případně kombinace přírodních látek a antibiotik, čímž by bylo docíleno posílení účinku jinak nepříliš vyhovujících, doposud používaných antibiotik.

Poděkování: Tato práce vznikla za finanční podpory grantu GAČR 14 – 23597S a ICT IGA projektu A2_FPBT_2014_035.

Literatura

1. Tande AJ, Patel R: *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 302 (2014).
2. Braem A, Mellaert LV, Mattheys T, et al.: *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 102, 215 (2013).
3. Maiorana A, Papi M, Bugli F, et al.: *Appl. Surf. Sci.* 279, 409 (2013).
4. Thebault P, Lequeux I, Jouenne T: *J. Wound Technol.* 21, 36 (2013).
5. Pandey R, Berendt AR, Athanasou NA: *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* 120, 570 (2000).
6. Steckelberg JM, Osmon DR: *Am. Soc. Microbiol.* 173 (2000).
7. Azzam K, Parvizi J, Jungkind D, et al.: *J. Bone. Joint. Surg. Am.* 91, 42 (2009).
8. Sendi P, Banderet F, Graber P, Zimmerli W: *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1098 (2011).
9. Zimmerli W, Moser C: *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 158 (2011).
10. Zimmerli W, Sendi P: *Semin. Immunopathol.* 33, 295 (2011).
11. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE: *Nat. Engl. J. Med.* 351, 1645 (2004).
12. Maderazo EG, Judson S, Pasternak H: *Clin. Orthop. Relat. Res.* 13, 131 (1988).
13. Barbari EF, Osmon DR, Carr A, et al.: *Clin. Infect. Dis.* 50, 8 (2010).
14. Zimmerli W, Ochsner PE: *Infection.* 31, 99 (2003).
15. Mei L, Busscher HJ, Van der Mei HC, Ren Y: *Dent. Mater.* 27, 770 (2011).
16. Churchley D, Rees GD, Barbu E, et al.: *Int. J. Pharm.* 352, 44 (2008).
17. Cao X, Pettit ME, Conlan SL, et al.: *Biomacromol.* 10, 907 (2009).
18. Dong B, Manolache S, Wong ACL, Denes FS: *Polym. Bull.* 66, 517 (2011).

Literatura (pokračování)

19. Hanna H, Benjamin R, Chatzinikolaou I, et al.: *J. Clin. Oncol.* 22, 3163 (2004).
20. Tiller JC, Liao CJ, Lewis K, Klibanov AM: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5981 (2001).
21. Ahearn DG, May LL, Gabriel MM: *J. Ind. Microbiol.* 15, 372 (1995).
22. Fekete A, Borbas A, Gyémant G, et al.: *Carbohydrate Res.* 346, 1445 (2011).
23. Řezanka T, Čejková A, Masák J: *Stud. Nat. Prod. Chem.* 38, 269 (2012).

Souhrn

Kvasničková E.: Problematika infekcí kloubních implantátů

Infekce kloubních implantátů je obtížné nejen diagnostikovat, ale především léčit. Tyto infekce vznikají díky mikrobiální adhezi na daný materiál a následně tvorbě biofilmu. Mikroorganismy ve formě biofilmu snadno získávají rezistenci vůči tradičně používaným antibiotikům. Jedinou možností léčby je v současné době další chirurgický zákrok v kombinaci s dlouhodobou léčbou antibiotiky. Byla popsána celá řada přírodních látek, které jsou účinné proti mikrobiální adhezi nebo fungují jako inhibitory quorum sensing a zároveň nepodporují vznik mikrobiální rezistence. Použití těchto látek je slibnou možností pro řešení problému infekcí kloubních náhrad.

Klíčová slova: kloubní implantáty, infekce, biofilm, přírodní látky, quorum sensing

Summary

Kvasničková E.: Prosthetic joint infections

The infections of prosthetic joints are not only difficult to diagnose, but also treat it. These infections occur by microbial adhesion on the surface and the formation of biofilm consequently. Microorganisms in biofilm soon develop a resistance against traditional antibiotics. Entirely one solution is known today – additional surgery in combination with long-term antibiotic therapy. Recently, there were described a wide range of natural products, which are able to decrease microbial adhesion or inhibit quorum sensing system and they do not support the emergence of microbial resistance. The use of these substances is promising way for solving the problem with these infections.

Keywords: prosthetic joints, infection, biofilm, natural products, quorum sensing

FERMENTAČNÍ VÝROBA BIO-BUTANOLU: SOUČASNÝ STAV A VÝZKUM VYUŽITÍ ALTERNATIVNÍCH SUBSTRÁTŮ

Jan Kolek

Ústav biotechnologie, VŠCHT v Praze; kolekj@vscht.cz

Úvod

Butanol je čtyřuhlíkatý alkohol, využitelný například jako rozpouštědlo, základní surovina pro výrobu bioplastů a dalších chemikálií či jako potenciální palivo nebo příměs pohonných hmot. Použití butanolu do pohonných hmot nabízí několik zásadních výhod oproti dnes běžně používanému bezvodému ethanolu. Je to především jeho vyšší energetická hustota, menší korozivní působení na kovové součásti, menší těkavost a výrazně nižší schopnost vázat vodu, která je často hlavním problémem užití ethanolu.

Aceton-butanol-ethanolové kvašení (ABE fermentace) je proces známý již více než 100 let, který poprvé kolem roku 1912 detailněji popsal Chaim Weizmann. Proces fermentační výroby organických rozpouštědel byl v minulosti hojně využíván a jedná se o jeden z prvních, ve velkém měřítku aplikovaných, průmyslových procesů vůbec. „Zlatým věkem“ ABE fermentace, bylo především období 2. světové války, kdy výrazně stoupla poptávka po acetonu, který byl jednou z důležitých komodit využívaných ve zbrojním průmyslu. Po období světových válek se průmysl přeorientoval především na produkci butanolu (díky fermentační výrobě je často označován jako bio-butanol), jako důležitého rozpouštědla a chemikálie pro syntézu dalších látek. Největší průmyslové provozy na výrobu butanolu se nacházely především na území Asie (Čína, Korea, Rusko) či dnešní Jihoafrické Republiky, kde byl poslední provoz uzavřen teprve v devadesátých letech 20. století. Menší závody vyrábějící organická rozpou-

štědla pomocí ABE fermentace však byly rozptýleny po celém světě, včetně USA a Evropy. V České Republice se nacházel průmyslový provoz výroby butanolu v polovině 50. let v obci Rájec nad Svitavou¹.

V 50. letech 20. století začal být butanol vyráběn metodou hydratace butanu, který je získáván, jako odpadní produkt při zpracování ropy na pohonné hmoty. Díky výrazně nižší ceně výroby touto cestou se ABE fermentace stala postupně absolutně nekonkurenceschopným procesem a všechny průmyslové provozy zaměřené na výrobu butanolu pomocí ABE fermentace byly postupně uzavřeny. Dnes je veškerý butanol vyráběn právě hydratací butanu. I přes tuto skutečnost je ABE fermentace intenzivně zkoumanou a často diskutovanou technologií, která by mohla přispět např. k řešení otázky efektivního zpracování odpadů. Navíc, s ohledem na fosilní charakter ropných paliv, by se v budoucnosti mohla stát ABE fermentace důležitou technologií pro produkci pohonných hmot a organických rozpouštědel.

ABE fermentace

ABE fermentace je životní strategií tzv. solventogenních druhů bakterií rodu *Clostridium*. Jedná se o striktně anaerobní, Gram-pozitivní bakterie, které během svého životního cyklu prochází složitou diferenciací zahrnující tvorbu odolných endospor. Mezi nejnámější a nejlépe popsané producenty rozpouštědel patří druhy *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii* a *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. Solvento-

genních druhů však existuje mnoho, dalšími známými producenty organických rozpouštědel jsou např. *Clostridium pasteurianum*, *Cl. roseum*, *Cl. tetanomorphum* a mnohá další.

ABE fermentace klasicky probíhá ve dvou fázích. V první (tzv. acidogenní) fázi dochází ke zpracování nejčastěji sacharidického zdroje uhlíku a energie na organické kyseliny. Konkrétně se tvoří především kyselina máselná, octová a mléčná. S tvorbou kyselin je také nevyhnutelně spojený pokles pH v kulturačním médiu (za předpokladu, že pH v systému není vyrovnáváno pomocí báze). Ve druhé, tzv. solventogenní fázi, probíhá přeměna části vytvořených organických kyselin na organická rozpouštědla. Tím dochází k opětovnému mírnému vzestupu pH média a je umožněno pokračování růstu produkčního mikroorganismu. Konec ABE fermentace je zpravidla charakterizován tvorbou spor a zastavením růstu biomasy i produkce metabolitů. Příklad průběhu ABE fermentace je zobrazen na obrázku 1.

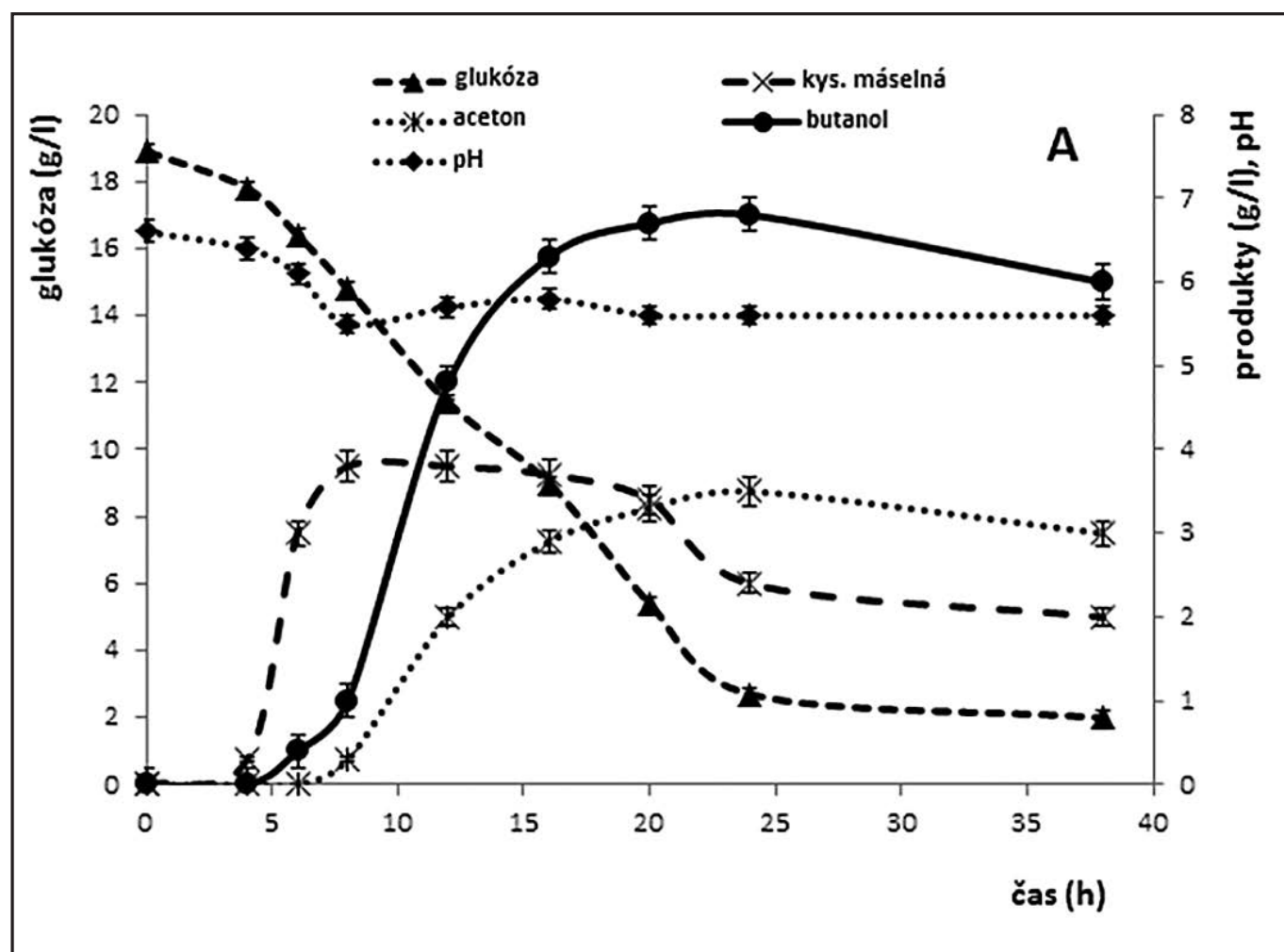
Typickými finálními produkty ABE fermentace jsou organické kyseliny (máselná, octová, mléčná) a aceton, butanol, ethanol v poměru zhruba 3:6:1. Některé solventogenní druhy se však mohou v proporcích produkovaných metabolitů i průběhu samotné fermentace výrazně odlišovat. *Cl. tetanomorphum* například

neprodukuje vůbec aceton a produkuje pouze ethanol a butanol v poměru cca 1:2². Některé kmeny *Clostridium beijerinckii* zase mohou produkovat namísto acetonu isopropanol³.

Problémy praktického využití ABE fermentace v současnosti

Hlavním problémem efektivního využití ABE fermentace v současnosti je nízká dosažitelná finální koncentrace organických rozpouštědel ve fermentačním médiu (typická finální koncentrace butanolu se pohybuje zhruba v rozmezí 5 – 17 g/l). Negativně přispívá samozřejmě i skutečnost, že přírodní producenti produkují butanol (nejvíce ceněný produkt s největší možností uplatnění) vždy společně s dalšími rozpouštědly a organickými kyselinami, což znesnadňuje jeho izolaci a purifikaci a také snižuje jeho celkovou výtěžnost. Pro izolaci butanolu z fermentačního média se standardně využívá jeho destilace.

Butanol je primární alkohol, tudíž je stejně jako jiné alkoholy (např. k desinfekci běžně využívaný ethanol) silně toxický pro bakteriální buňky. Alkoholy obecně způsobují destabilizaci a narušování cytoplasmatických membrán, degradaci či precipitaci extracelulárních i intracelulárních proteinů či narušení enzymových aktivit uvnitř buňky. Butanol je pro bakteriální buňky obec-



Obr. 1: Příklad průběhu ABE fermentace: použitý producent *Clostridium pasteurianum* NRRL B-598, TYA médium²⁴, zdroj uhlíku a energie glukóza 20 g/l, 37°C.

ně toxický ještě více než ethanol a způsobuje zastavení růstu a smrt bakteriálních buněk již v koncentraci okolo 0,5 – 1 % (v/v).

Druhým, neméně významným problémem ABE fermentace je vysoká cena vstupního substrátu. Typickými substráty pro ABE fermentaci jsou sacharidy. Dle využití tohoto produkčního kmene, lze použít jako substrát pro fermentaci šesti- i pětiuhlíkaté monosacharidy (glukóza, fruktóza, arabinóza, xylóza atd.), disacharidy (sacharóza, maltóza, laktóza atd.) i polysacharidy (škrob nebo pektiny). V průmyslových provozech se v minulosti nejčastěji používala melasa (zbytkový produkt vzniklý při výrobě cukru) či různě předupravené škrobnaté substráty (zemědělské odpady a zbytky). Příkladem v minulosti průmyslově užívaných substrátů je např. kukuřičná kaše předupravená působením vysoké teploty a tlaku nebo odpady získané při mletí mouky předupravené působením silných kyselin či louhů⁴.

Největší podíl z celkové ceny bio-butanolu tvoří právě náklady na samotný substrát. Hlavní úspory v celém procesu ABE fermentace by bylo tedy možné docílit výrazným zlevněním této vstupní suroviny. Jednou z nabízejících se možností je použití odpadních, nevyužívaných substrátů, které mohou být velmi levné. Další možností je zavedení substrátů nových, které by mohli být taktéž získávány za velmi nízké ceny. Mezi tyto alternativní, potenciálně využitelné substráty se uvažuje např. surový glycerol, plynné substráty, substráty na bázi lignocelulózy a další, méně obvyklé substráty.

Alternativní substráty pro ABE fermentaci

Glycerol

Surový glycerol je jedním ze dvou hlavních vedlejších produktů vznikajících během transesterifikační reakce při výrobě bionafty. V posledních letech výroba bionafty výrazně vzrůstá a zvyšuje se tedy také množství odpadního glycerolu vzniklého během výroby. Surový glycerol obsahuje mnoho příměsí, především methanol, vodu, mýdlo a anorganické soli, přičemž obsah těchto látek se velmi liší podle použitého postupu výroby a použité vstupní suroviny (různé rostlinné oleje). Např. obsah vody může takto fluktuovat mezi 6 – 26 %⁵. Tyto příměsi mohou negativně ovlivňovat růst mikroorganismů, na druhou stranu je však cena surového glycerolu, jako odpadní suroviny, o poznání nižší než cena sacharidů použitelných pro fermentace.

Nejnámější klostridia schopná využít glycerol jsou řazena do druhu *Clostridium pasteurianum*. Produkce 1,3-propandiolu a butanolu byla v minulosti demonstrována např. s použitím kmenu *Clostridium pasteurianum* DSM 525, kdy bylo při použité koncentraci glycerolu 60 g/l dosaženo finální koncentrace butanolu až 18 g/l⁶. Tato i další publikované práce však využívají, jako modelový substrát čistý glycerol a prozatím pouze v několika případech bylo skutečně odzkoušeno použití surového glycerolu. Při porovnání obou druhů glycerolu bylo ukázáno, že použití surového glycerolu vedlo ke snížení celkové produkce rozpouštědel až o 20 %⁷. Při využití glycerolu, jako substrátu pro ABE fermentaci, tedy lze získat poměrně vysokou koncentraci butanolu a při použití odpadního surového glycerolu lze také dramaticky snížit náklady za substrát pro fermenta-

ci. Problémem je na rozdíl od použití sacharidů málo prozkoumaná technologie výroby a omezené množství odpadního glycerolu vyprodukovaného průmyslovými provozy, jelikož odpadní glycerol je dnes běžně využíván jinými konkurenčními technologiemi (např. kosmetickým průmyslem).

Plynné substráty

Nezvyklým zdrojem uhlíku a energie pro ABE fermentaci může být také oxid uhelnatý, fermentační plyny obsahující CO₂ s příměsí H₂, nebo tzv. syntetický plyn neboli syngas. Použití těchto plynů je výhodné především z hlediska ekonomiky (jedná se o v současnosti zcela nevyužívané substráty) i flexibility jejich použití. Vhodné plynné směsi lze získat, jako vedlejší produkt různých, především anaerobních kultivací. Touto cestou však lze zpravidla získat jen omezené množství plynného substrátu. Při využití CO lze uvažovat také o sprážením procesu např. s různými spalovnami, kde by se vznikající směs CO a CO₂ obohacená o malé množství vodíku přiváděla přímo do fermentačního média, jako zdroj uhlíku. K využití pro ABE fermentaci by však tato směs musela být zároveň zbavená zbytkového kyslíku a dalších plynných složek, které by mohli inhibovat růst anaerobních klostridií. Využití čistých, komerčně dodávaných plynů je v tomto případě z hlediska ekonomiky procesu naprosto vyloučené.

Zajímavou možností je výroba tzv. syntetického plynu (syngasu) metodou zplyňování biomasy. Ke zplyňování lze použít různé lignocelulóзовé substráty, jako je např. odpadní dřevo (dřevní štěpka, hobliny, piliny atd.), sláma nebo zemědělské produkty (proso, kukuřice, odpady z mletí zrnin, atd.). Jedná se o termochemickou metodu, při které je biomasa převedena na plyn, složený zejména z CO, CO₂ a H₂, přičemž účinnost přenosu energie touto metodou může dosahovat až 80 %⁸. Prvním krokem zplyňování je předúprava substrátu, zahrnující jeho dokonalou homogenizaci, vysušení, popř. zformování do malých pelet nebo rozemletí do práškové formy. Další možností předúpravy je např. krátkodobé kompostování, které zvyšuje celkový obsah ligninu, čímž se zvyšuje výsledný obsah H₂ v plynu⁹. Samotné zplynění je prováděno působením vysoké teploty za definovaného tlaku a přístupu O₂. V první fázi (teplota 100 – 200°C) dochází k úplnému dosušení biomasy. Ve druhé fázi (teplota vyšší než 200°C, bez přístupu O₂) dochází k termálnímu rozkladu substrátu (pyrolýze), jejímu zuhelnatění a k uvolňování plynných uhlovodíků. Po pyrolýze vzniká stabilní směs zuhelnatěné biomasy, methanu, CO, CO₂ a dehtu (Puig-Arnavat et al. 2010). V další fázi je do systému přiveden atmosférický kyslík. Dochází k oxidaci zuhelnatěné biomasy za uvolnění CO, CO₂ a vody. Dle podmínek reakce (teplota, tlak a obsah O₂) lze ovlivnit výrazně poměr CO:CO₂ v konečném plynu. Při nedostatečném vzdušnění totiž dochází pouze k částečné oxidaci a vzniká více CO, což může být prospěšné např. právě pro růst některých klostridií. Finálním krokem je endotermická redukce při teplotě 800 – 1000°C¹⁰. Takto připravený syngas obsahuje samozřejmě mnoho dalších příměsí. Především se jedná o methan a vodu a dále např. o ethan, ethen, ethyn, benzen, naftalen,

amoniak, kyanidy nebo oxidy dusíku a síry. Plyn tedy před případným použitím musí projít ještě finálním přečistěním¹¹.

Clostridium carboxidivorans je producent butanolu izolovaný v roce 2005 z mořského sedimentu, který je schopen růst heterotrofně za použití klasických cukerných substrátů, ale také autotrofně za utilizace CO nebo syngasu. Produkty fermentace jsou především kyselina octová, ale také kyselina máselná, ethanol a butanol¹². Na rozdíl od většiny ostatních solventogenních druhů zcela postrádá dráhu pro produkci acetonu¹³. Patrně nejznámějším a nejvíce zkoumaným solventogenním druhem, který je schopen využívat CO a syngas, jako zdroj uhlíku a energie je *Clostridium ljungdali*. Nejedná se sice přímo o producenta butanolu, je však schopen produkovat ethanol a další důležitou základní chemikálii – 1,3-butandiol. Podobnými, syngas a CO využívajícími producenty jsou ještě *Clostridium autoethanogenum* a *Clostridium ragsdalei*. Nadějně se v tomto případě zdají být pokusy o genetickou modifikaci kmenů využívajících syngas. Jejich hlavním cílem je vložení biosyntetické dráhy butanolu do těchto producentů a následná pomalá produkce butanolu ze syngasu ve vysoké koncentraci. Prozatím byly popsány pokusy o produkci butanolu právě pomocí *Cl. ljungdali* a *Cl. autoethanogenum* a produkci acetonu pomocí *Cl. acetivum*¹⁴.

Využití syngasu je prozatím velmi neprobádanou oblastí ABE fermentace a stejně tak samotný postup výroby syngasu prozatím většinou nedosahuje kvality potřebné pro fermentaci, aniž by docházelo k inhibici růstu mikroorganismů nebo znatelnému snížení koncentrace produktů. Hlavním problémem také zůstává velmi malá koncentrace vznikajících rozpouštědel, která je v tomto případě ještě o poznání nižší, než při klasickém provedení ABE s cukerným substrátem (finální koncentrace rozpouštědel se pohybuje v rozmezí cca do 1 g/l). Největší předností procesu je možnost poměrně účinného zpracování lignocelulózových substrátů a také fakt, že syngas, fermentační ani spalinaový plyn není v současnosti využíván k fermentačnímu zpracování a tato technologie tedy může otevřít zcela nové možnosti jejich využití.

Lignocelulózové substráty

Jedna z možností využití lignocelulózových substrátů byla již popsána výše – k výrobě syngasu. Mnohem častěji je však v současnosti uvažována hydrolýza těchto substrátů na jednoduché, zkvasitelné cukry, které mohou být následně použity pro ABE fermentaci. Lignocelulóza je základní stavební materiál rostlin. Jedná se o kompaktní polymer tvořený především celulózou (polysacharid sestávající z podjednotek glukózy), hemicelulózami (polysacharid tvořený glukózou, dalšími monosacharidy a uronovými kyselinami) a ligninem (polyfenolická amorfní látka), jejichž zastoupení se výrazně liší podle druhu materiálu. Prvním krokem hydrolýzy lignocelulolytického materiálu je vždy jeho vhodná předúprava. Prvním, nezbytným krokem, je stejně jako v případě výroby syngasu jeho vysušení, mletí a homogenizace. Dalším krokem je oddělení celulózy, hemicelulózy a ligninu. Toto je zcela zásadní krok, je-

likož celulózové mikrofibrily jsou kryty vrstvou hemicelulózy, která je pevně vázána pomocí kovalentních vazeb na okolní lignin¹⁵. V tomto stavu je totiž lignocelulóza prakticky nedostupná pro enzymy, které jsou schopny rozkládat celulózu a hemicelulózy na jednoduché, zkvasitelné cukry. Pro tuto prvotní úpravu bylo vyvinuto mnoho postupů, jako je např. parní expanze, kyselá nebo zásaditá hydrolýza za vysoké teploty a tlaku, SPORL (spolupůsobení siřičitanu a kyseliny sírové), AFEX (působení amoniaku), atd.¹⁶. Předupravený substrát je již možné hydrolyzovat pomocí celulolytických enzymů a vzniklé monosacharidy použít, jako substrát pro fermentaci. Největším problémem hydrolýzy lignocelulózy je vysoká cena celulolytických enzymů, poměrně drahá předúprava substrátu a také vznik inhibitorů bránících růstu fermentujících mikroorganismů, které mohou vznikat během prvotní předúpravy. Pro ABE fermentaci byly jako hlavní inhibující složky popsány kyselina mravenčí a rozpuštěný lignin¹⁷ nebo produkty rozpadu ligninu a hemicelulózy, jako je syringaldehyd, kyselina ferulová nebo kyselina *p*-kumarová.

V literatuře lze najít mnoho prací zaměřených na produkci organických rozpouštědel z lignocelulózových substrátů. Příkladem může být práce, kde byla použita pšeničná sláma předupravená pomocí kyselé hydrolýzy. Hydrolýzát byl následně enzymaticky sacharifikován pomocí celuláz a použit jako substrát pro *Clostridium beijerinckii* P260. Takto bylo docíleno výsledné koncentrace všech rozpouštědel okolo 25 g/l¹⁸. V jiné práci byly zase použity rýžové otruby předupravené kyselou hydrolýzou. S použitím typového kmene *Cl. beijerinckii* NCIMB 8052 bylo dosaženo celkové koncentrace rozpouštědel 16,42 g/l (z toho 12,24 g/l butanolu)¹⁹.

Zcela oddělenou skupinou klostridií jsou celulolytická klostridia. Mezi ně patří termofilní, mezofilní i psychrofilní druhy, které jsou schopny rozkládat celulózu a přímo jí využívat, jako zdroj uhlíku a energie. Žádné z prozatím popsaných celulolytických klostridií bohužel neprodukuje butanol. Existuje však několik druhů, které produkují ethanol a jsou tedy potenciálně využitelné pro jeho výrobu. Stejně tak jsou tyto druhy intenzivně zkoumány pro možnost vnesení syntetických enzymatických drah pro produkci butanolu nebo dalších rozpouštědel či jejich ko-kultivace se solventogenními kmeny. Celulolytická klostridia jsou v přírodě hojně zastoupena v anaerobních habitatech, kde se spoluúčastní rozkladu lignocelulózových materiálů²⁰.

Další substráty

Nezvyklým substrátem, který může být využitelný pro ABE fermentaci je např. biomasa jednobuněčných či mnohobuněčných řas. Řasy mohou růst autotrofně pouze za dodávky světla, CO₂ a přítomnosti základních minerálních solí a jsou schopny akumulovat např. glycerol, mastné kyseliny nebo polysacharidy. Řasová biomasa také celkově obsahuje mnoho organických látek, esenciálních pro růst mikroorganismů. Jejich hlavní nevýhodou je velmi pomalý růst (doba zdvojení se pohybuje okolo 24 h), nárůst do relativně nízké hustoty při autotrofním růstu a také fakt, že technologie pro pěstování řas ve velkém měřítku nejsou příliš rozšířené ani probádané^{21, 22, 23}.

Dalšími potenciálně využitelnými substráty uváděnými v literatuře jsou např. odpady vznikající při výrobě sýrů, obsahující vysoký podíl zbytkových sacharidů (především laktózy) a zároveň syrovátkový protein (využitelný za jistých okolností jako zdroj dusíku), odpady vzniklé po vylisování moštu z jablek či jiného ovoce, sulfidové výluhy a další odpady papírenského průmyslu či destilační výpalky⁴.

Závěr

ABE fermentace v současném stavu poznání nemůže konkurovat výrobě butanolu z ropy a nelze zatím uvažovat o jeho plošné výrobě touto cestou. Jelikož se však ropa řadí mezi fosilní paliva, spolu s neustále se zvyšující spotřebou a ztenčováním světových zásob ropy lze očekávat neustálé zvyšování její ceny. Na druhou stranu lze očekávat další progres ve výzkumu ABE fermentace, včetně pokroku v metodách metabolického a genového inženýrství, které může vést k vytvoření nových, lepších kmenů. Nelze opomenout např. ani výzkum

technologíí pro „in-situ“ odstraňování a izolaci butanolu z fermentačního média přímo během fermentace (např. pomocí stripování) nebo vývoj lepšího světového odpadového hospodářství, které může výrazně pomoci zlevnit a zpřístupnit alternativní substráty použitelné pro ABE fermentaci, které jsou momentálně bez dalšího užítu skládkovány. Výrazný posun lze také očekávat v technologii hydrolýzy celulólytických materiálů, výrobě syngasu nebo dokonce v přímé přeměně celulóly na butanol. Při souhrě těchto mnoha faktorů je možné, že by se v budoucnu ABE fermentace mohla stát opět procesem, který má své platné místo v průmyslové výrobě a může být vhodným řešením pro výrobu organických rozpouštědel a to až už pro přímou spotřebu ve formě např. pohonných hmot, nebo jako substrátu pro výrobu dalších chemikálií.

Poděkování: Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20/2014)

Literatura

1. Patakova P, Toure SSM, Šimáček P, et al.: *Listy Cukrov. Repar.* 127, 46 (2011).
2. Gottwald M, Hippe H, Gottschalk G: *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 573 (1984).
3. George HA, Johnson JL, Moore WE, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1160 (1983).
4. Jones DT, Woods DR: *Microbiol. Rev.* 50, 484 (1986).
5. Almeida JR, Favaro LC, Quirino BF: *Biotechnol. Biofuels.* 5, 48 (2012).
6. Biebl H: *J. Ind. Microbiol.* 27, 18 (2001).
7. Taconi KA, Venkataramanan KP, Johnson DT: *Environ. Prog. Sustain.* 28, 100 (2009).
8. McKendry P: *Biores. Tech.* 83, 55 (2002).
9. Barneto AG, Carmona JA, Galvez A, et al.: *Energ. Fuel.* 23, 951 (2009).
10. Puig-Arnavat M, Bruno JC, Coronas A: *Sust. Energ. Rev.* 14, 2841 (2010).
11. Xu DS, Tree DR, Lewis RS: *Biomass. Bioenerg.* 35, 2690 (2011).
12. Liou JSC, Balkwill DL, Drake GR, et al.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2085 (2005).
13. Bennett GN, Rudolph FB: *FEMS Microbiol. Rev.* 7, 241 (1995).
14. Tirado-Acevedo O, Chinn MS, Grunden AM: *Adv. Appl. Microbiol.* 70, 57 (2010).
15. Hall GS: *Nature.* 310, 521 (1984).
16. Jurgens G, Survase S, Berezina O, et al.: *Biotechnol. Lett.* 34, 1415 (2012).
17. Wang L, Chen HZ: *Process. Biochem.* 46, 604 (2011).
18. Qureshi N, Saha BC, Hector RE, et al.: *Biomass. Bioenerg.* 32, 168 (2008).
19. Lee J, Seo E, Kweon DH, et al.: *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 482 (2009).
20. Vodovnik M, Logar RM: *Acta. Chim. Slov.* 57, 767 (2010).
21. Nakas JP, Schaedle M, Parkinson CM, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1017 (1983).
22. Potts T, Du JJ, Paul M, et al.: *Prog. Sustain.* 31, 29 (2012).
23. Ellis JT, Hengge NN, Sims RC, et al.: *Biores. Tech.* 111, 491 (2012).
24. Patáková P, Lipovský J, Čížková H, et al.: *Czech. J. Food. Sci.* 27, 276 (2009).

Souhrn

Kolek J.: Fermentační výroba bio-butanolu: současný stav a výzkum využití alternativních substrátů

ABE fermentace je proces, kterým lze vyrábět organická rozpouštědla. Nejvíce ceněným produktem s největším rozsahem uplatnění je butanol, který může být použit, jako alternativní palivo či příměs pohonných hmot, ale také je to důležitá základní surovina pro výrobu chemikálií. V současnosti je veškerý butanol vyráběn z ropy, kvůli výrazně nižší ceně výroby. V budoucnu by se však ABE fermentace mohla stát opět důležitou technologií k výrobě organických rozpouštědel. Výrazné úspory by mohlo být docíleno využitím alternativních substrátů, kterými mohou být např. surový glycerol, lignocelulózy hydrolyzáty, plynné substráty, řasová biomasa a další.

Klíčová slova: ABE, butanol, rozpouštědla, *Clostridium*, alternativní substráty

Summary

Kolek J.: Production of bio-butanol by ABE fermentation: current state and investigation of an alternative substrates

ABE fermentation is process which could be used for organic solvents production. Butanol is the most valuable product of this process. It can be use as alternative biofuel, its additive and also as raw material for chemical industry. Nowadays, whole butanol production is achieved through the refining of oil because of its lower price. In the future ABE could be important for organic solvents production again. Using of alternative substrates could lead to considerable savings in ABE fermentation. These substrates are for example: crude glycerol, lignocellulosic substrates, algae biomass etc.

Keywords: ABE, butanol, solvents, *Clostridium*, alternative substrates

INHIBICE PCR A JEJÍ DETEKCE

Tereza Sovová, Jaroslava Ovesná

Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha; ovesna@vurv.cz

Úvod

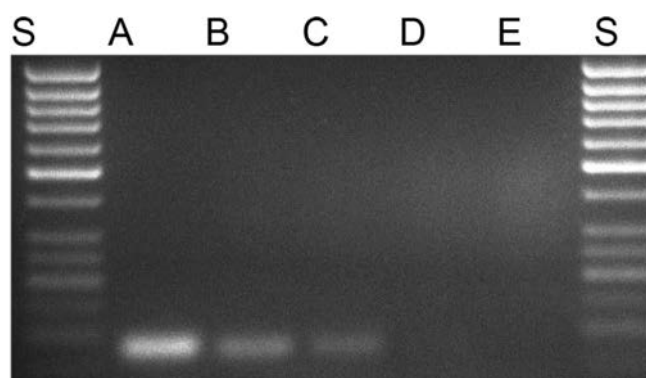
Polymerázová řetězová reakce, známá pod zkratkou PCR z anglického „polymerase chain reaction“, se od svého objevu v 80. letech minulého století stala jednou ze základních metod detekce přítomnosti živých či odumřelých organismů a identifikace variability jejich genetického základu. Díky variantám metody jako real-time PCR je možná též kvantifikace nukleových kyselin ve vzorku¹. Jednoduchý princip a proveditelnost spolu s vysokou reprodukcibilitou, robustností, citlivostí a specifičností metody jsou důvodem rychlého rozšíření a zavedení široké škály aplikací nedlouho po jejím objevu¹. Díky schopnosti detekovat i malá množství DNA v široké paletě vzorků z různých zdrojů se používá v mnoha aplikacích v oblasti molekulární biologie, přírodních věd, zemědělství i medicíny. Mimo použití ve výzkumu nachází uplatnění v diagnostice, identifikaci a kvantifikaci mikroorganismů, identifikaci transgenů v geneticky modifikovaných organismech nebo forenzní analýze^{1,2,3,4}.

Metoda spočívá v exponenciálním namnožení určitého úseku cílové DNA na principu DNA replikace: nejprve dochází k denaturaci DNA a rozpojení dvoušroubovice vlivem zvýšené teploty, následuje duplikace jednotlivých řetězců pomocí enzymu DNA polymerázy a tento proces je opakován, dokud nedojde k syntéze dostatečného počtu kopií, které mohou být vizualizovány. To, který úsek DNA bude při reakci zmnožen, určují tzv. primery – oligonukleotidy o délce okolo 20 nukleotidů komplementární k cílovému úseku, který ohraničují. Namnoženou DNA je pak možné vizualizovat v agarózovém elektroforetickém gelu pomocí UV záření a vhodného barviva (nejčastěji ethidium bromid) nebo je prokázat fragmentační analýzou fluorescenčně značených úseků v kapilární elektroforéze. Tímto způsobem je však možné pouze prokázat (ne)přítomnost daného úseku DNA. Při real-time PCR je možné porovnáním s vhodným standardem DNA i kvantifikovat. V reakční směsi je totiž přítomná tzv. fluorescenční sonda, která více či méně specificky dosedá na právě amplifikovaný úsek DNA a emituje fluorescenční záření, jehož intenzita je úměrná počtu přítomných kopií DNA¹. Další možností je digitální PCR, která umožňuje absolutní kvantifikaci na základě statistického rozdělení přítomnosti nebo absence příslušného amplikonu.

Inhibitory a enhancery PCR

PCR je velice citlivá a spolehlivá metoda zejména v případě, že ze vzorku lze získat dostatečně purifikovanou DNA. DNA ale bývá izolována ze složitých matic, které mohou do vzorku uvolňovat různé látky, které mohou probíhající PCR reakci ovlivňovat. Tak zvané inhibitory mohou reakci částečně nebo i plně inhibovat^{5,6,7}. To může mít za následek sníženou citlivost, respektive falešný negativní výsledek^{5,7}. To se projevuje sníženou intenzitou fluorescence při real-time PCR

nebo nepřítomností příslušného proužku při elektroforetickém zobrazení u klasické PCR³ (Obr. 1). Obsah daného úseku DNA ve vzorku je tak podhodnocen. Látky s opačným stimulujícím efektem, tzv. enhancery, jsou méně časté a způsobují zase jeho nadhodnocení⁸. Pro správnou interpretaci obdržených výsledků je tedy nutné případnou inhibici (příp. stimulaci) identifikovat a určit její míru³. Inhibitory se ve velkých množstvích vyskytují zejména v potravinářských a forenzních vzorcích; s případnou inhibicí je ale nutné počítat i u ostatních vzorků, neboť látky s inhibujícím účinkem se do reakční směsi mohou dostávat i při vzorkovacím procesu, úpravě vzorku nebo izolaci DNA^{3,5,8}.



Obr. 1: Elektroforetické zobrazení produktů PCR reakcí probíhající bez (A) a za přítomnosti NaCl v reakční směsi (B: 70 mM, C: 80 mM, D: 90 mM, E: 100 mM).

Inhibice PCR reakce je poměrně komplexní jev, který závisí na mnoha faktorech. Mimo druhu a koncentrace inhibitoru závisí i na typu použité polymerázy a ostatních složek reakční směsi, protože různé typy směsí mají různou schopnost případnou inhibici vyrovnat. Záleží i na délce a složení cílové DNA, přičemž delší řetězce s vyšším obsahem guaninu a cytosinu jsou k inhibici náchylnější³.

Inhibující účinky byly pozorovány u celé řady látek, ne u všech byl ale objasněn přesný mechanismus efektu. Nejčastěji se můžeme setkat s třemi možnými mechanismy. Inhibitory mohou ovlivňovat DNA polymerázu, například ji degradovat nebo denaturovat tak, že již nemůže katalyzovat duplikaci cílové DNA sekvence. Nepřímo lze enzym ovlivnit například chelatací Mg^{2+} kationtů, které jsou důležitým kofaktorem nezbytným pro správnou funkci enzymu. Inhibující látky mohou také působit přímo na cílovou DNA, a to buď degradací řetězce, nebo navázáním se na cílovou sekvenci. Některé látky také stíní nebo absorbují fluorescenční záření, případně jinak reagují s použitým fluoroforem⁸.

Shrnutí různých inhibitorů spolu s mechanismem účinku je uvedeno v Tab. 1. Při navrhování DNA analýzy vzorku je nutné případ od případu uvažovat možné přítomné inhibitory ve všech fázích procesu. Mezi inhibitory pocházející přímo z matrice vzorku patří hem, imu-

noglobuliny a laktoferrin v krvi, žlučové kyseliny a polysacharidy ve fekáliích, huminové látky v půdě, melanin v kůži a vlasech, myoglobin ve svalové tkáni, plasmin a vápenaté ionty v mléce, prachové částice ve vzduchu nebo barviva jako například indigo v textilu⁹. Inhibitory pocházející z procesu odebrání a úpravy vzorku mohou být obsaženy v materiálu, ze kterého se vzorek odebrá nebo ze vzorkovacích pomůcek. Například alginát, který je obsažen v speciálních stěrkách pro odebrání nasofaryngeálních vzorků, nebo prášek přidávaný do latexových rukavic (nejčastěji se jedná o CaCO₃ nebo škrob) jsou silné inhibitory PCR⁹. Mezi účinné inhibitory patří také fenol používaný při purifikaci DNA, proteázy používané při izolaci DNA nebo složky médií pro kultivaci mikroorganismů⁸. Pro správnou funkci PCR analy-

zy je tedy nutné optimalizovat všechny kroky analýzy od odebrání vzorku, přes jeho úpravu, izolaci DNA až po složení reakční směsi a použité enzymy a primery. Je nutné také vzít v úvahu, o jaký vzorek se jedná a kolik je v něm obsaženo DNA. Jiný přístup je nutný při odebrání klinických vzorků, které jsou často homogenní a sterilní (krev, moč, atd.) a je snadné kontrolovat jejich odebrání a uchování. Naproti tomu forenzní, potravinářské nebo přírodní vzorky jsou odebrány často v prostředí, kde může snadno dojít ke kontaminaci, a mohou mít velice složitou a často neznámou matici, které může obsahovat mnoho inhibujících složek⁹. U těchto vzorků může být odebrání vzorku i samotná PCR analýza tedy mnohem složitější a časově i cenově náročnější.

Tab. I: Přehled látek inhibujících PCR a real-time PCR (podle Hedman and Rådström, 2013⁹)

Původ inhibitoru	Látka	Zdroj	Mechanismus
Odebírání vzorku	Al ³⁺	Používání hliníkových nástrojů	Změna iontového složení
	Alginát	Použití pomůcek s alginátem vápenatým	Adsorpce Mg ²⁺ nebo polymerázy
	Celulóza, nitrocelulóza	Vzorkovací filtry	Navázání na DNA
Vzorek, matrice	Bilirubin	Fekálie	Kompetice s templátem
	Ca ²⁺	Mléčné výrobky	Kompetice s Mg ²⁺
	Kolagen	Kosti	Změna iontového složení vázáním kationtů
	EDTA	Antikoagulant	Chelace Mg ²⁺
	Formaldehyd	Konzervant	Interference s DNA a DNA polymerázou
	Fulvokyseliny	Půda	Navázání na polymerázu
	Hem	Krev	Uvolnění iontů železa a kompetice s templátem
	Huminové látky	Půda	Stínění fluorescence, interakce s polymerázou a přisedáním primerů
	Imunoglobulin G	Krev	Navázání na DNA
	Kyselina fytoová	Fekálie	Chelace Mg ²⁺ nebo změna iontového složení
	Laktoferin	Krev	Uvolnění iontů železa
	LiCl	Růstové médium	Změna iontového složení
	Melanin	Kůže, vlasy	Navázání na polymerázu
	MgCl ₂	Růstové médium	Změna koncentrace Mg ²⁺
	Močovina	Moč	Interakce s polymerázou a přisedáním primerů
	Myoglobin	Svalová tkáň	Uvolnění iontů železa
	NaCl		Změna iontového složení
	Polysacharidy	Fekálie	Navázání na polymerázu
	Proteinázy (plasmin)	Mléčné výrobky	Degradace polymerázy
	Třísloviny	Půda	Navázání na polymerázu
	Huminové látky	Půda	Stínění fluorescence, interakce s polymerázou a přisedáním primerů
	Žlučová kyseliny	Fekálie	Navázání na polymerázu
	Úprava vzorku	Ethanol	Izolace DNA
Ethidium bromid		Izolace DNA	Navázání na DNA
Fenol		Přečištění DNA	Denaturace a navázání na polymerázu
Heparin		Antikoagulant	Adsorpce na DNA, kompetice s templátem, interakce s polymerázou
Isopropanol		Izolace DNA	Srážení DNA
KAc/K ₂ Cr ₂ O ₇		DNA extrakce	Změna iontového složení
NaOH		DNA extrakce	Degradace DNA, denaturace polymerázy
NH ₄ Ac		DNA extrakce	Změna iontového složení
Polyethylenglykol		Izolace DNA	Srážení DNA
Polymerní povrchy		Spotřební materiál	Adsorpce detekčních barviv, jako např. SYBR Green
Volné radikály		UV záření	Reakce s polymerázou

Detekce a kvantifikace inhibice PCR

Opatrným provedením a zvolením vhodného způsobu vzorkování nebo zpracování vzorku lze výskyt a množství inhibitorů ve vzorku snížit. V některých případech ale ani nejpečlivějším postupem není možné inhibující složky zcela eliminovat a u vzorků s neznámou nebo velmi složitou matricí to často ani není možné. Každá PCR analýza by tedy měla být doprovázena i vhodným sledováním případné inhibice, což je důležité zejména v diagnostice, kde je nutné identifikovat případné falešně negativní výsledky. Čistotu DNA lze stanovit spektrofotometricky či na základě měření fluorescence. Hodnoty optické hustoty vzorku při určitých vlnových délkách odhalí znečištění bílkovinami či dalšími látkami absorbujícími v měřeném spektru. Přítomnost jiných inhibujících látek je nutné ověřit jinými metodami^{5,6,7}.

Jedním z možných způsobů je určení efektivity amplifikace. Spočívá v konstrukci kalibrační křivky získané analýzou několika sériových ředění daného vzorku^{5,6,7}. Ředěním koncentrace inhibitorů klesá, což má za následek zvýšení sklonu kalibrační křivky a efektivity je pak vyšší než 1. Tento postup je ale poměrně časově náročný a spotřebuje velké množství reagensů. Nehodí se také pro vzorky s nízkou koncentrací DNA⁵. Dalším způsobem je použití cizorodou DNA, která je v různých koncentracích přidána ke stejnému objemu daného vzorku; koncentrace inhibitorů tak v tomto případě zůstává stejná a odpadá problém s nízkou koncentrací cílové DNA^{5,7}. Tento způsob ale stále neřeší časovou i finanční náročnost.

Mnohem rychlejším a elegantnějším způsobem, jak odhalit inhibici PCR reakce, je použití takzvané interní kontroly^{5,6,7}. Interní kontrola (IK) je exogenní DNA přítomná na rozdíl od (externí) pozitivní kontroly přímo v dané PCR reakci a je koamplifikována spolu s cílovým vzorkem^{5,6,7}. Protože je výchozí koncentrace IK známa, lze určit, zda a do jaké míry byla PCR inhibována. Při amplifikaci může IK využívat stejných primerů jako cílové sekvence; pak se jedná o tzv. kompetitivní IK, neboť „soutěží“ s cílovou frekvencí o tytéž primery^{2,3,6}. Zde je nutné optimalizovat použitou koncentraci vzorku i IK, aby nedocházelo k přednostní amplifikaci kontroly na úkor vzorku. Je nutné i vhodně zvolit délku IK, pro-

tože kratší sekvence bývají amplifikovány rychleji, než sekvence delší³. Pro IK je také možné použít speciální primery, pak ji nazýváme jako nekompetitivní^{2,6}. V reakční směsi jsou tak přítomny dvě různé sady primerů, což může zase způsobovat problematické interakce mezi jednotlivými primery. Vhodný typ IK je tedy nutno zvolit v závislosti na konkrétním vzorku a použitých primerech^{2,6}. Asi nejjednodušším způsobem je přidání cizorodé DNA (tzv. chimérická DNA), případně upravit cílovou sekvenci odstraněním, vložením nebo nahrazením některých nukleotidů (tzv. mimická DNA)^{2,6,9}. Je možné i vyvinout zcela unikátní DNA sekvenci, která není podobná žádné jiné v přírodě se vyskytující. IK se často vkládá do plasmidových vektorů pro lepší stabilitu i snadnější použití. Pro dlouhodobé skladování je možné výsledný plasmid vložit do bakteriální konzervy⁹. Interní kontroly byly vyvinuty pro mnoho různých PCR analýz zejména pro detekci patogenních bakterií^{2,4,5,7,10} a použití IK je doporučováno i v některých ISO normách¹¹.

Závěr

I přes vysokou robustnost a opakovatelnost jsou postupy využívající metodu PCR poměrně citlivé na přítomnost látek, které mohou průběh reakce inhibovat, případně stimulovat. Vzhledem k tomu, že se v dnešní době PCR používá i pro kontrolní účely a v klinických stanoveních, je nutné eliminovat veškeré vlivy, které by mohly výsledek reakce zkreslit. Určité látky však nelze během zpracování vzorku odstranit a některé kroky při zpracování dokonce mohou vzorek nechtěně o rušivé látky obohatit. Proto celý postup analýzy musí být monitorován systémem kontrol. Hledají se postupy, které umožňují přítomnost rušivých látek spolehlivě odhalit a které jsou zároveň časově i cenově nenáročné. Mezi ty můžeme zařadit systém interních kontrol ve formě plasmidů s referenční sekvencí DNA, která neinterferuje se samotnou reakcí. Tyto interní kontroly je ale nutné vždy optimalizovat pro využití v různých reakčních směsích.

Poděkování: Tento příspěvek byl připraven s podporou projektu Ministerstva zemědělství ČR č. MZe RO0414 a projektu Národní agentury pro zemědělský výzkum č. QI101B267.

Literatura

1. Rodríguez-Lázaro D, Hernández M (2013): Introduction to the Real-time Polymerase Chain Reaction. In: *Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications* (Rodríguez-Lázaro D ed.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, 3 – 20.
2. Deer DM, Lampel KA, González-Escalona N: *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 366 (2010).
3. Cook N, de Ridder GA, D'Agostino M, et al. (2013): Internal Amplification Controls in Real-time Polymerase Chain Reaction-based Methods for Pathogen Detection. In: *Real-Time PCR in Food Science: Current Technology and Applications* (Rodríguez-Lázaro D ed.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, 35 – 42.
4. Renault T, Arzul I, Lipart C: *J. Virol. Methods* 121, 17 (2004).
5. Hartman LJ, Coyne SR, Norwood DA: *Mol. Cell. Probes* 19, 51 (2005).
6. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 1863 (2004).
7. Nordstrom JL, Vickery MCL, Blackstone GM, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5840 (2007).
8. Bickley J, Hopkins D (1999): Inhibitors and Enhancers of PCR. In: *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation* (C. SG and C. PH ed.), LGC (Teddington) Ltd., Cambridge, UK, 81 – 100.
9. Hedman J, Rådström P (2013): Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR. In: *PCR Detection of Microbial Pathogens* (Wilks M ed.), Humana Press, New York, 17 – 48.
10. Lübeck PS, Wolffs P, On SLW, et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5664 (2003)
11. ISO 22119:2011 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2011

Souhrn

Sovová T., Ovesná J.: Inhibice PCR a její detekce

Polymerázová řetězová reakce, známá pod anglickou zkratkou PCR, se od svého objevu v 80. letech minulého století stala jednou ze základních metod detekce a kvantifikace nukleových kyselin. Díky vysoké rychlosti, citlivosti a specifitě se používá v mnoha aplikacích v oblasti molekulární biologie, přírodních věd, zemědělství i medicíny. Do reakční směsi se ale mohou ze vzorku nebo v průběhu jeho zpracování dostat látky, které mohou PCR reakci inhibovat nebo stimulovat. Výsledkem je pak nadhodnocení, resp. podhodnocení obsahu DNA ve vzorku. Inhibiči PCR reakce lze rozpoznat pomocí určení efektivity reakce, spočívající v analýze sériových ředění vzorku. Rychlejší a elegantnější způsob spočívá v použití interní kontroly, což je nejčastěji exogenní DNA, která je koamplifikována spolu se vzorkem.

Klíčová slova: polymerázová řetězová reakce, inhibitor, efektivity, interní kontrola

Summary

Sovová T., Ovesná J.: Inhibition of PCR and its detection

Since its discovery in the 1980', the polymerase chain reaction (PCR) has become one of the main methods for detection and quantification of nucleic acids. Because of its speed, sensitivity and specificity, PCR is used in many applications in molecular biology, life sciences, agriculture and medicine. However, many substances may get into in the reaction mixture from the sample or during the sample processing that can inhibit or enhance the PCR reaction. As a result, the DNA content in the sample is under- or overestimated, respectively. It is possible to indentify the inhibition by evaluating the efficiency of the PCR reaction by analysing serial dilutions of the sample. More elegant and faster method consists in using an internal control which is a usually exogenous DNA coamplified with the target DNA.

Keywords: polymerase chain reaction, inhibitor, efficiency, internal control

Mycobacterium tuberculosis: NEPŘEKONATELNÝ NEPŘÍTEL

Iva Machová, Iva Pichová

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v.; iva.machova@uochb.cas.cz

Úvod

Mycobacterium tuberculosis (MTb) je patogenní bakterie, jejímž jediným hostitelem a zároveň rezervoárem jsou lidé. MTb způsobuje onemocnění zvané tuberkulóza, v minulosti označované též „bílý mor“ či „souchoť“. Existence tuberkulózy je spjata s lidmi po tisíceletí. Nejstarší důkazy pocházejí z dob starého Egypta. Na více než 5000 let starých kostrách egyptských mumii byly nalezeny kosterní abnormality typické pro infekci MTb. Analýza DNA a další současné metody výskyt MTb na těchto kostrách potvrdily. V průběhu 19. století vypukla napříč Evropou a severní Amerikou velká epidemie tuberkulózy, jež způsobila úmrtí tisíců osob ročně. Tato událost inspirovala i řadu soudobých literárních autorů (E. Brönte, C. Dickens). Původce tuberkulózy (*Mycobacterium tuberculosis*) byl prvně identifikován až v roce 1882 německým lékařem a mikrobiologem Robertem Kochem, který je považován za zakladatele bakteriologie a je držitelem Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu z roku 1905.

K výraznému pokroku v prevenci tuberkulózy přispěli Albert Calmette a Camille Guérin zavedením tzv. atenuované (oslabené) vakcíny BCG (z franc. Bacille Calmette-Guérin), připravené z příbuzného organismu *Mycobacterium bovis*. BCG vakcína byla poprvé úspěšně aplikována v roce 1921 novorozenci, jehož matka i babička trpěly tuberkulózou. Po druhé světové válce Světová zdravotnická organizace (z angl. WHO – World Health Organisation) zahájila první program na kontrolu tuberkulózy, který zahrnoval testování asymptomatických osob tuberkulinovým testem a následné očkování osob s negativní odezvou na tuberkulin. Během tří let této kampaně bylo otestováno téměř 30 milionů osob a více než 14 milionů bylo očkováno BCG vakcínou. Opravdový průlom v léčbě tuberkulózy lze spojovat s objevením streptomycinu v roce 1944, prvního antibiotika s bakteriocidními účinky působícího

cího i na MTb. V roce 1952, resp. 1957 následovalo zavedení dalších antituberkulotik isoniazidu a rifampicinu¹. S rozšířením účinných antibiotik se tuberkulóza stala léčitelnou chorobou a neoptimističtější odhady předpovídaly její velmi brzké vymýcení. Tyto předpoklady se však nenaplnily.

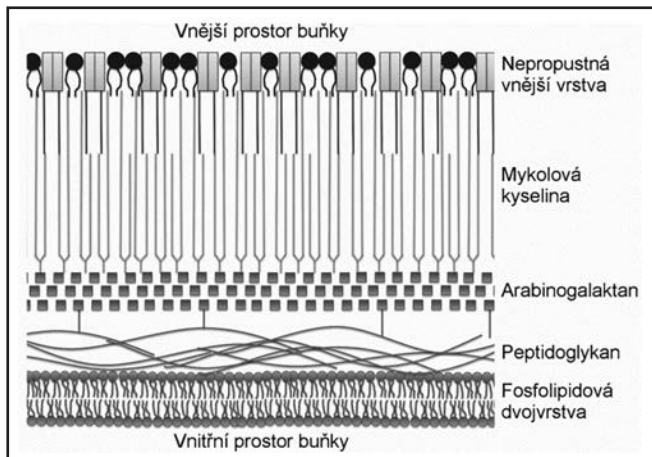
Dle WHO bylo v roce 2013 zaznamenáno 9 milionů nových případů aktivní tuberkulózy a 1,5 milionů osob zemřelo v důsledku této nemoci. Společně s HIV/AIDS je tuberkulóza nejrozšířenějším infekčním onemocněním na světě. K většině smrtelných případů tuberkulózy dochází především v rozvojových zemích, kde prevence a dodržování dlouhodobé léčby nejsou na takové úrovni jako ve vyspělých státech. Tuberkulóza představuje také velké riziko pro osoby infikované HIV. Téměř jedna čtvrtina lidí nakažených tímto virem zemře v důsledku koinfekce s MTb².

Co dělá infekci Mtb navzdory dostupné léčbě a existenci vakcíny tak neporazitelným protivníkem?

Příčin může být mnoho, některé významné faktory jsou shrnuty v následujícím textu

1. MTb má velmi odolnou buněčnou stěnu

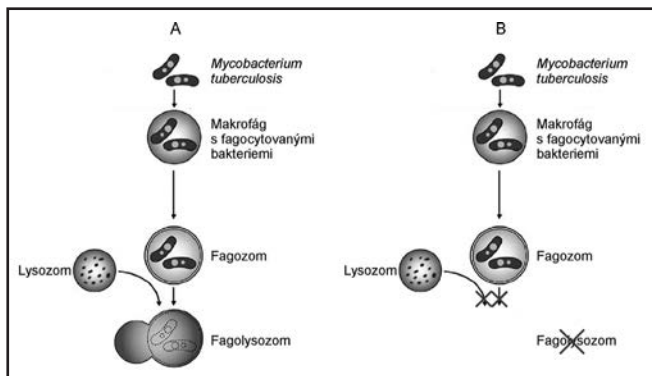
Nejdůležitějším faktorem v tuberkulóze je samotný patogen, který onemocnění způsobuje. *Mycobacterium tuberculosis* je bakterie, jejíž bakteriální stěnu tvoří dvě vrstvy (Obr. 1) – horní vrstva se skládá z volných lipidů s krátkými i dlouhými mastnými kyselinami a dolní vrstvu obsahující komplex peptidoglykanu, arabingalaktanu a kyseliny mykolové vázaných kovalentními vazbami. Tento komplex kyselina mykolová-arabingalaktan-peptidoglykan zůstává neporušen i po chemickém rozrušení buněčné stěny bakterií. To přispívá jak k enormní odolnosti bakterie proti léčivům, tak atakům imunitnímu systému a vnitřní prostředí bakterie je tak chráněno před vlivy vnějšího prostředí³.



Obr. 1: Stavba buněčné stěny *Mycobacterium tuberculosis*.

2. MTb umí oklamat imunitní systém

MTb se obvykle přenáší v aerosolových kapénkách vykašláváných infikovaným člověkem. Po vdechnutí těchto kapének zdravým člověkem přechází bakterie přes plicní sklípky do plic. Obecně jsou cizorodé bakterie rozpoznány imunitním systémem a je tak zahájen proces jejich eliminace z organismu. V první linii imunitní odezvy jsou především plicní makrofágy, které bakterie pohlcují, následně se přeměňují na fagozomy, které splývají s lysozomem a vzniká fagolysozom (Obr. 2A). Ve fagolysozomu je pohlcená bakterie vystavena nepřátelskému prostředí reaktivních kyslíkových meziproduktů metabolismu (H_2O_2 , superoxid), kyselému pH, lysozomálním enzymům a dalším vlivům, jejichž společný účinek vede k odstranění pohlcených bakterií z organismu.



Obr. 2: Schematické znázornění procesu účinné eliminace cizorodé bakterie z organismu (A) a procesu vzniku latentní infekce MTb (B).

Tabulka I. Základní léčebný režim TB – isoniazid (INH), rifampicin (RIF), ethambutol (EMB), pyrazinamid (PZA)

Preferovaný léčebný režim	Alternativní léčebný režim	Alternativní léčebný režim
Úvodní fáze Denně INH, RIF, PZA a EMB* 56 dávek (8 týdnů)	Úvodní fáze Denně INH, RIF, PZA a EMB* 14 dávek (2 týdny), následně 2× týdně 12 dávek (6 týdnů)	Úvodní fáze 3× týdně INH, RIF, PZA a EMB* 24 dávek (8 týdnů)
Pokračovací fáze Denně INH a RIF 126 dávek (18 týdnů) nebo 2× týdně INH a RIF 36 dávek (18 týdnů)	Pokračovací fáze 2× týdně INH a RIF 36 dávek (18 týdnů)	Pokračovací fáze 3× týdně INH a RIF 54 dávek (18 týdnů)

*EMB může být z léčby vyřazen, pokud je daný kmen MTb citlivý k INH, RIF, PZA⁷.

Při infekci MTb dochází k pohlcení bakterie makrofágy, ale v některých případech může MTb efektivně bránit splynutí fagozomu s lysozomem (Obr. 2B) a nedochází tedy ke zničení bakterií. Přesné mechanismy, které mykobakterie používají pro své přežití v makrofágách, jsou předmětem intenzivního výzkumu. Obranný mechanismus mykobakterie proti hostitelskému organismu je ale natolik účinný, že bakterie dokáže přežít skrytá ve fagozomech řadu let i desetiletí bez jakýchkoliv symptomů nemoci. Tento stav se označuje jako tzv. latentní infekce. Podle odhadů WHO až třetina světové populace je latentně infikována. MTb v latentní fázi vyčkává na oslabení imunitního systému hostitelského organismu spojeného např. protirakovinnou terapií, koinfekcí s HIV, imunosupresivními léky (při transplantacích), podvýživou nebo stárnutím. Tento stav snížené imunity vede k množení MTb a uvolnění do plic (pulmonární TB), popřípadě se bakterie může dostat do krevního řečiště a tím do kterékoliv části lidského organismu (extrapulmonární TB). Uvolněním bakterií do organismu a jejich množením dochází ke vzniku tzv. aktivní tuberkulózy, která je infekční a vyžaduje léčbu pomocí antibiotik. V současné době není dostupný žádný lék proti latentní infekci MTb.

3. Rezistence MTb k antibiotikům

První rezistentní kmeny MTb byly popsány krátce po rozšíření prvního antituberkulotika streptomycinu. V současnosti trvá standardní léčba aktivní tuberkulózy obvykle 6 – 9 měsíců a skládá se z tzv. úvodní fáze, která trvá přibližně 2 měsíce antibiotiky především s bakteriocidním účinkem, kdy dochází k usmrcení dělících se bakterií a většinou vyžaduje hospitalizaci pacienta. Bezprostředně následuje tzv. fáze pokračovací (4 až 6 měsíců) antibiotiky se sterilizačním účinkem, které eliminují i bakterie s omezenou funkcí dělení. V této fázi léčby už pacient není infekční pro své okolí. Příklady léčebných režimů uvádí Tabulka 1.

Aktuálně se stává velkým problémem tzv. multiléková rezistence bakterií k podávaným antibiotikům, která vede k selhání léčby tuberkulózy. Příčinou vzniku rezistence může být neadekvátní léčebný režim, přerušovaná léčba nebo předčasně ukončená léčba, která má za následek selekci kmenů odolných proti jednomu či více antibiotikům. Nejzávažnější formou multilékové rezistence je tzv. extenzivní léková rezistence (značena XDR-TB), kdy MTb je rezistentní k fluorochinolovým

antibiotikům isoniazidu, rifampicinu a minimálně jednomu ze tří parenterálních antibiotik capreomycinu, kanamycinu a amikacinu. Léčba tohoto druhu tuberkulózy obvykle trvá 18 až 24 měsíců a zahrnuje antibiotika tzv. druhé řady, u nichž je zvýšené riziko negativních účinků^{4,5}. V roce 2009 byl u 15 osob v Íránu popsán kmen MTb s tzv. totální rezistencí, který je odolný vůči všem používaným antituberkulotikům⁶.

4. (Ne)účinnost BCG vakcíny

V současné době je jedinou dostupnou vakcínou proti TB téměř sto let stará BCG vakcína. Tato vakcína je rutinně podávána v řadě zemí jako součást základního očkování u dětí (většinou do stáří 1 roku) a představuje ochranu proti řadě forem tuberkulózy. Účinnost BCG vakcíny je neúplná a velmi kolísá u dospívajících a dospělých, především u plicní formy TB, která je nejčastější formou šíření nemoci. Důvod proč je tato vakcína účinná u dětí, ale ne u dospělých zatím není zcela známý. Předpokládá se, že významnou roli hraje imunitní systém, který u dětí ještě není plně vyvinut. Dalšími faktory, které ovlivňují účinnost BCG vakcíny je koinfekce s hlísty (problém především v rozvojových zemích), viry oslabující imunitní systém (např. HIV) a netuberkulózní mykobakteriemi (např. *Mycobacterium avium*), které způsobují aktivaci imunitního systému. Očkování BCG vakcínou představuje velké zdravotní riziko pro lidi s genetickým defektem v klíčových genech imunitního systému nebo děti s HIV infekcí. V těchto případech může dojít k tzv. diseminované BCG nemoci, která je na první pohled nerozeznatelná od tuberkulózy⁸. Na základě těchto zjištění WHO nedoporučuje očkování BCG vakcínou u dětí s HIV.

V České republice bylo plošné očkování BCG vakcínou dětí ukončeno k 1. 11. 2010. Děti lze tedy očkovat proti

TB pouze na žádost rodičů a přeočkování se již zcela neprovádí. V dnešní době je v různých fázích klinického testování přibližně 20 vakcín založených na oslabených kmenech mykobakterií, BCG či MTb, nebo na rekombinantní fúzi MTb proteinu s nosičem⁹.

Závěr

V 90. letech 20. století byla tuberkulóza zařazena na WHO mezi celosvětové hrozby, čímž byla TB uvedena do popředí zájmu vědců i zdrojů financování. Brzy poté byl zmapován genom MTb a výzkum tuberkulózy se stal multidisciplinární záležitostí, která zahrnuje obory buněčné biologie, imunologie, metabolomiky, enzymologie aj. Pro návrh nových účinných léčiv je nezbytné znát co nejpodrobněji metabolismus bakterie v různých fázích infekce. Ze současných poznatků víme, že metabolismus bakterie přežívajících v makrofágách v latentní formě je utlumen na nezbytné minimum a výrazně se liší od metabolismu bakterií v aktivní fázi množení. Velký potenciál pro návrh racionálních léčiv představuje centrální uhlíkový metabolismus zahrnující citrátový cyklus a glykolýzu/glukoneogenezi, v němž byly na základě metabolomických studií vytipovány některé enzymy, které jsou ve zvýšené míře exprimovány za latentní infekce, např. isocitrátlyasa, fosfoenolpyruvát karboxykinasa, fosfofruktokinasa aj^{10,11}. Druhou výraznou linií výzkumu je vývoj nových vakcín s vysokou účinností pro děti i dospělé.

Poděkování: Výzkum metabolismu *Mycobacteria tuberculosis* v různých fázích infekce byl financován z projektu EU-PF7 SystemTB Collaborative Project 241587, projektem 7E111070, programem NPU LO 1302, a RVO 61388963 od MŠMT.

Literatura

1. Daniel TM: *Respir. Med.* 100, 1862 (2006).
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en>. (2014).
3. Brennan PJ: *Tuberculosis* 83, 91 (2003).
4. Potrepčiaková S, Skříčková J: *Practicus* 4, 24 (2008).
5. Bártů V: *Interní medicína pro praxi* 9, 372 (2007).
6. Velayati AA, et al.: *Chest* 136, 420 (2009).
7. <http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/treatment/treatmentHIVnegative.htm>. (2014).
8. Ottenhoff THM, Kaufmann SHE: *PLoS Pathog.* 8, e1002607 (2012).
9. Andersen P, Kaufmann SHE: *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, (2014).
10. Shi L, et al.: *Mol. Microbiol.* 78, 1199 (2010).
11. Machová I, et al.: *J. Biol. Chem.* 289, 13066 (2014).

Souhrn

Machová I., Pichová I.: *Mycobacterium tuberculosis*: nepřekonatelný nepřítel

Tuberkulóza je jednou z nejstarších nemocí, a přestože je k dispozici řada léků, je v současnosti nejrozšířenější bakteriální infekcí ve světě a společně s HIV je největším zabijákem. Přispívá k tomu vysoký výskyt MTb kmenů s rezistencí k současně používaným lékům a zvýšená citlivost HIV pozitivních pacientů k nákaze MTb. Více než třetina světové populace je nakažena MTb, které přežívá v latentní podobě u lidí bez příznaků a může být kdykoliv reaktivována snížením imunity, či ko-infekcí dalšími patogeny. Proto je v současnosti urgentní potřeba porozumět mechanismům, kterými se MTb brání imunitnímu systému člověka a které umožňují této bakterii dlouhodobě přežít v hostiteli. Tyto poznatky umožní vývoj léků s novým mechanismem účinku.

Klíčová slova: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberkulóza, latentní infekce, resistance, metabolismus, léky

Summary

Machová I., Pichová I.: *Mycobacterium tuberculosis*: unbeatable enemy

Tuberculosis (TB), one of the oldest human diseases, is still one of the biggest killers, despite the availability of drugs. Increased prevalence of multidrug-resistant MTb strains and dramatically increasing host susceptibility to MTb in HIV-1 positive patients contribute to high prevalence of this bacterial disease. Almost one-third of the world's population is infected with MTb. In the majority of these cases, MTb persists in macrophages in a latent form and can be re-activated any time by immunosuppression or co-infection with other pathogens. Thus, there is an urgent need for better understanding of MTb metabolism, its adaptation to latency, and for discovery of new anti-tuberculosis drugs.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, tuberculosis, latent infection, resistance, metabolism, drugs

POUŽITÍ JEDNOBUNĚČNÝCH ŘAS JAKO SUBSTRÁT PRO VÝROBU BIOPLYNU

Tomáš Podzimek¹, Jan Bartáček²

¹Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, ²Ústav technologie vody a prostředí, VŠCHT Praha; podzimet@vscht.cz

Úvod

V poslední době se bouřlivě rozvíjejí biotechnologické aplikace v různých oblastech lidského konání. U využití jednobuněčných řas tomu není jinak. Tyto na první pohled jednoduché organismy v sobě skrývají velký biotechnologický a komerční potenciál do budoucna. Můžeme začít s jejich druhovou diverzitou, která je obrovská a dosud ne zcela prozkoumána. Pak můžeme vzít v úvahu různé skupiny látek, které ten který druh produkuje (proteiny, lipidy, polysacharidy, antioxidanty, pigmenty a vitaminy) a jejich variabilitu, ze které získáme určitou představu o kvantitě a pestrosti potenciálních produktů. Některé z produktů se již dnes využívají v potravinářském a kosmetickém průmyslu, v zemědělství a v medicíně. Pro ilustraci uvedme někoho z příkladů řas – *Spirulina*, *Dunaliella*, *Chlorella* nebo *Haematococcus*. V neposlední řadě jsou jednobuněčné řasy zkoumány pro využití v palivářském průmyslu jako zdroj mastných kyselin pro výrobu bionafty, která by jednoho dne mohla nahradit docházející ropu¹. Nespornou výhodou těchto organismů je schopnost využít sluneční energii (která je dosud zdarma) a přeměnit ji na energii chemickou (a to efektivněji než je tomu u rostlin)². Další výhodou je jejich poměrně rychlý růst a výtěžek biomasy na hektar plochy. V tomto přehledu se podíváme na potenciální biotechnologické využití jednobuněčných řas v energetice¹.

Zemní plyn

Nejprve je třeba uvést energetiku do vztahu s produkcí methanu. Methan je hlavní složkou zemního plynu, jehož spálením se získává primární tepelná energie. Tu je možno použít přímo nebo přeměnit na energii mechanickou anebo dále až na elektrickou. Zemní plyn je jedním z hlavních zdrojů energie využívaného v současné světové energetice. Běžně se užívá v průmyslu a v domácnostech (vytápění, ohřev vody, vaření atd.). Dále slouží jako pohonná hmota u vozidel v podobě LNG nebo CNG.

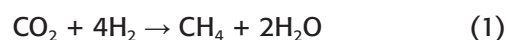
Největší naleziště zemního plynu jsou na Středním Východě, v Africe, Číně nebo Rusku. I když jsou současné zásoby plynu pro lidstvo zatím dostatečné, jednoho dne se musejí zákonitě vyčerpat. Navíc každým rokem stoupá celosvětová spotřeba všech zdrojů energie a ne všechny země mají přístup k zemnímu plynu, tudíž jsou závislé na dovozu z ciziny. Největší naleziště plynu se vyskytují v zemích, které jsou politicky nestabilní, což dále může komplikovat bezpečnost dodávek plynu a výrazně ovlivňovat celosvětový trh. V neposlední řadě, těžba sama o sobě není vždy šetrná k přírodě. Výhodou je, že tento zdroj produkuje poměrně čistou energii (dokonalým spalováním vzniká „pouze“ oxid uhličitý) a existuje pro něj dostupná infrastruktura. Proto má

smysl hledat řešení výroby methanu a tím z něj udělat obnovitelný zdroj energie – pro použití plynu jako paliva, ale také pro výrobu elektrické energie. Je třeba podotknout, že methan hraje svou roli také v chemickém průmyslu (výroba CO₂, sazí jako barviva, acetylenu a vodíku).

Bioplyn a anaerobní kal

Methan je také složkou bioplynu. Zatímco na vzniku zemního plynu se podílely také geologické procesy trvající miliony let (proto není obnovitelným zdrojem energie), bioplyn vzniká pouze působením anaerobních mikroorganismů. Tyto mikroorganismy pocházejí z domény *Archea* a patří mezi ně např. rody *Methanosaeta*, *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanomicrobium*, *Methanothermobacter* ad. Methan vzniká všude, kde se vyskytují methanogenní organismy (např. ve střevech přežvýkavců a lidí, v mokřadech, v jezerních i mořských sedimentech, extrémofilní methanogenní mikroorganismy byly nalezeny v horkých pramenech)³.

Methanogenní organismy jsou také přítomny v anaerobních kalcích a digestátech, tj. v obsahu anaerobních fermentorů zpracovávajících čistírenské kaly, energetické plodiny a organické odpady. Tyto kaly jsou obývány pestrou škálou mikroorganismů ze všech tří domén – *Archea*, *Eukaryota* a *Bacteria*. Moderními sekvenciálními technikami bylo odhaleno zastoupení jednotlivých druhů mikroorganismů v různých kalcích, pocházejících z různých míst na Zemi⁴. Celý kal je komplexním ekosystémem, ve kterém jsou různé druhy mikroorganismů propojeny vzájemnými vazbami. Tyto vazby jsou dány odlišnými metabolickými strategiemi jednotlivých druhů, což v praxi znamená, že produkty jednoho organismu slouží jinému jako substrát⁵. Methanogenní mikroorganismy využívají substráty produkované acetogenními a acidogenními organismy a produkují methan dvěma cestami – hydrogenotrofní(1) a acetotrofní(2). V anaerobních podmínkách je methanogeneze posledním krokem dekompozice biomasy. Hydrogenotrofní cestou vzniká methan tak, že dochází k redukci CO₂ pomocí vodíku. Zdrojem vodíku jsou např. vodík produkující fermentativní bakterie (např. *Clostridium* sp.). Acetotrofní cesta využívá kyselinu octovou, která je rozložena na methan a CO₂ a podle výzkumů tato cesta výrazně převažuje nad hydrogenotrofní⁵.



Využití řas pro produkci methanu

V současnosti je anaerobní stabilizace kalů důležitou složkou čistíren odpadních vod v České republice (městských i průmyslových). Anaerobní kal je také

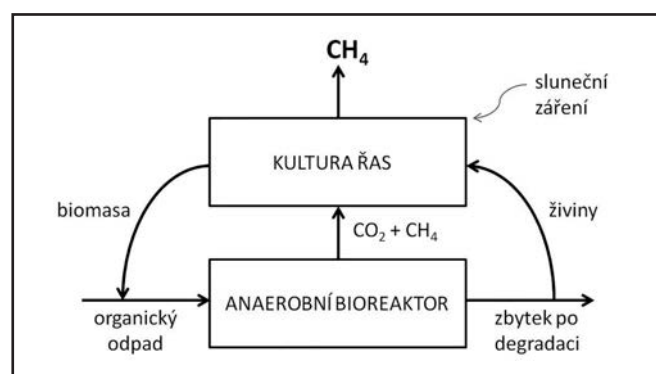
součástí bioplynových stanic. Bioplynové stanice zpracovávají komunální, průmyslový a zemědělský odpad (a energetické plodiny). Podle internetových stránek České bioplynové asociace, se na území České republiky nachází přes 550 bioplynových stanic. Z bioplynu produkovaného v těchto stanicích se v roce 2013 vyrobilo přes 2,2 TWh elektřiny (z celkové produkce 87 TWh), což bylo o 34 % více než elektřiny vyrobené ze zemního plynu. V celé Evropě je instalováno do konce přes 14 000 bioplynových stanic⁵.

V posledních letech se začíná prosazovat pěstování řas jako alternativního zdroje biomasy pro bioplynové stanice¹. Kromě již zmíněné vysoké plošné produkce řas je jejich velkou výhodou možnost pěstování i v takových oblastech, kde zemědělské plodiny pěstovány být nemohou (např. oblasti s neúrodnou půdou, nebo bývalých průmyslových oblastí). Pěstování řas, ač také náročné na plochu, tedy nemusí kolidovat s pěstováním plodin využívaných pro produkci potravin.

Alternativou k přímé produkci methanu z řas je produkce bioethanolu z polysacharidů, nebo bionafty z tuků obsažených v řasách v prvním stupni a anaerobní fermentace řas v druhém stupni. Ačkoli dříve byla tato varianta preferována, ukazuje se, že její energetická bilance není nikdy pozitivní a přímá produkce bioplynu se tedy jeví jako perspektivnější⁶.

Projekt ALGAENET

V současné době se studuje možnost využití jednobuněčných řas jako energetického substrátu pro methanogenní bakterie v rámci celé řady výzkumných projektů po celém světě. Jedním z nich je projekt „Renewable energy production through microalgae cultivation: Closing material cycles (ALGAENET)“. Tento projekt je financován EU v rámci 7. rámcového programu (Marie Curie Actions – International Research Staff Exchange) a spojuje výzkumná pracoviště v ČR, Španělsku a Chile⁷. Idea projektu vychází z jednoduché bilance, kdy produkovaný methan je spálen a přeměněn na energii a vedlejším produktem je CO₂, který je vrácen do systému jako zdroj uhlíku pro růst řas (Obr. 1). Tuto ideu by bylo možné realizovat v případě elektrárny, která by v sobě spojovala produkci řas a výrobu elektrické energie. CO₂ uvolněný spálením je tedy zabudován do buněčných struktur a není uvolněn do atmosféry. V ideálním případě tedy vzniká (z hlediska uhlíku) neutrální energie.



Obr. 1: Kultivace řas a produkce methanu v anaerobním reaktoru v uzavřeném cyklu⁷.

Vzniklý bioplyn se musí dále upravovat v závislosti na jeho budoucím použití, protože obsahuje kontaminující plyny (CO₂, H₂S ad.), které snižují obsah methanu a jejich spálením vznikají další nežádoucí plyny vypouštěné do atmosféry (např. SO₂). H₂S je zároveň vysoce korozivní a toxický. Absorbci CO₂ v kultuře řas je možné dosáhnout kvality biomethanu požadované pro vtlačení do plynárenských sítí (v ČR je požadováno vyhláškou č. 459/2012 Sb. alespoň 95% obsah CH₄, obsah CO₂ maximálně 5%, O₂ maximálně 0,5%)⁸. Důležité je také udržet nízkou koncentraci O₂ v bioplynu, protože při dosažení určitého poměru množství obou plynů vznikne výbušná směs. Při průchodu bioplynu kulturou řas se tedy absorbuje CO₂, ale zároveň se methan nebezpečně kontaminuje kyslíkem (produkovaný řasami). Proto je nutné ještě na závěr zařadit krok, který by snížil koncentraci kyslíku.

Výhody a nevýhody

Řasy potřebují pro svůj růst hlavně sluneční záření jako zdroj energie a CO₂ jako zdroj uhlíku. Oba zdroje jsou dostupné v závislosti na geografické poloze. Odpadá tedy přidávání energetických substrátů, jako je glukosa nebo škrob. Jak bylo uvedeno výše, CO₂ lze dodávat do kultury ze spalování methanu a z produkce bioplynu.

Výhodou kultivace řas oproti energetickým plodinám je krátká generační doba. Kontinuální přísun řas do anaerobního fermentoru bude samozřejmě prvním klíčovým bodem celého systému. Po celém světě existují firmy, které se velkoprodukcí jednobuněčných řas pro komerční účely zabývají (např. USA, Španělsko a Japonsko), takže tato technologie je dostupná a je možné ji dále zdokonalovat za účelem zvyšování výtěžku a snižování nákladů. Produkce řas má vyšší výtěžky na hektar oproti rostlinám^{1,2}. Řasy jsou kultivovány v tubulárních nebo deskových fotoreaktorech nebo v takzvaných „raceway ponds“ (mělké bazény), které je možno budovat v místech nevhodných pro zemědělskou produkci. Tím pádem tato zařízení nutně nemusí zmenšovat plochu pro růst hospodářských plodin⁹.

Zásadní nevýhodou použití řas jako substrátu tkví v tom, že jsou to živé organismy opatřené ochrannou buněčnou stěnou. Dostupnost metabolizovatelných substrátů (lipidy, sacharidy a proteiny) ukrývajících se uvnitř buňky je tedy hlavním limitujícím krokem a efektivita produkce methanu bude záviset na degradovatelnosti stěny. Tuto nevýhodu lze řešit nalezením takové řasy, jejíž buněčná stěna je lépe degradovatelná (existují rozdíly v chemickém složení mezi jednotlivými druhy řas) nebo využít metodu narušení buněk (mechanická, tepelná nebo chemická předúprava) před samotným vstupem do anaerobního bioreaktoru. V současné době se v rámci projektu ALGAENET také zkoumá použití mutované řasy, která nemá kompletní buněčnou stěnu, a tudíž by mohla být lépe degradovatelná než divoký typ.

Limitujícím faktorem pro růst řas je dostupnost slunečního záření. Nejvíce záření dopadá na oblasti kolem rovníku a směrem od něho intenzita záření klesá. V některých geografických pásmech je intenzita

dále ovlivněna ročním obdobím. Tyto poznatky je nutné vzít v úvahu při projektování elektrárny ve vybrané lokalitě. Kromě světla je také třeba vzít v úvahu dostupnost zdroje sladkovodní nebo mořské vody v závislosti na druhu řasy.

Z hlediska energetické bilance je stále velmi problematická vysoká spotřeba energie pro čerpání a míchání suspenze řas v reaktorech a na sklizení (zahušťování) řas. Tubulární i deskové reaktory jsou sice vysoce efektivní pro tvorbu i relativně koncentrovaných suspenzí, ale jsou z energetického hlediska velice náročné (nehledě na jejich vysoké konstrukční náklady). Oproti tomu šetrnější a levnější reaktory typu „raceway“ dosahují podstatně nižších objemových (a tedy i plošných)

výtěžků biomasy, což významně prodražuje sklizení (sedimentace, odstředování, filtrace)¹.

Závěr

Celý koncept v sobě ukrývá, ostatně jako každý nový přístup, mnoho technických komplikací, které je nutno odstranit. V současnosti nemůže produkce bioplynu ekonomicky soutěžit s těžbou a distribucí zemního plynu, stejně tak jako produkce lipidů a výroba bio-nafty není levnější než těžba a zpracování ropy. Na druhou stranu, nynější výzkum využití řas v energetice a palivářství nám poskytuje určité možnosti do budoucna, do doby, kdy nebudeme moci počítat se zásobami fosilních paliv.

Literatura

1. Chisti Y: *Biotechnol. Adv.* 25, 294 (2007).
2. Priyadarshani I, Rath B: *J. Algal Biomass Utiln.* 3, 89 (2012).
3. Straka F, Dohányos M, Zábranská J, et al.: Bioplyn. GAS s. r. o., Říčany (2006).
4. Yang Y, Yu K, Xia Y, et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5709 (2014).
5. <http://www.czba.cz/>, staženo 11. listopadu 2014.
6. Torres Á, Famoso FG, Rincón B, et al. (2013): Challenges for Cost-Effective Microalgae Anaerobic Digestion. In: *Biodegradation – Engineering and Technology*. (Chamy R., Rosenkranz F. eds.), InTech, 139 – 159.
7. <http://www.2020-horizon.com/ALGAENET-Renewable-energy-production-through-microalgae-cultivation-Closing-material-cycles%28ALGAENET%-29-s2454.html>, staženo 11. listopadu 2014.
8. <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2012-459>, staženo 11. listopadu 2014.
9. <https://www.wageningenur.nl/en/show/Cost-reduction-in-large-scale-microalgae-production.htm>, staženo 17. 11. 2014.

Souhrn

Podzimek T., Bartáček J.: Použití jednobuněčných řas jako substrát pro výrobu bioplynu

V současné době je celosvětově vynakládáno velké úsilí na nahrazení fosilních zdrojů energie obnovitelnými zdroji (biomasa, slunce, vítr atd.), které by navíc nezatěžovali zemskou atmosféru produkcí skleníkových plynů. Ukazuje se, že nelze očekávat příchod jedné univerzální technologie, ale je nutné využívat mnoho různých zdrojů tak, aby byla zohledněna geografická a ekonomická specifika konkrétní oblasti, kde se energie vyrábí. Jedním z možných zdrojů energie je produkce bioplynu z biomasy řas pěstovaných za tímto účelem ve speciálních reaktorech. Tento článek dává stručný přehled metod energetického využívání řas a zmiňuje hlavní ekonomické a technologické výzvy pro úspěšné zvládnutí této technologie. Zároveň je zmíněn evropský projekt „Renewable energy production through microalgae cultivation: Closing material cycles (ALGAENET)“, který spojuje výzkumná pracoviště v České republice (VŠCHT Praha), Španělsku a Chile.

Klíčová slova: bioplyn, anaerobní kal, jednobuněčné řasy

Summary

Podzimek T., Bartáček J.: Utilization of microalgae as a substrate for biogas production

Recently, a great effort is being put on the development of new technologies allowing energy production from renewable source that would not produce greenhouse gases. It is becoming increasingly apparent that one should not expect the advent of a new universal technology that would replace the entire energy production from fossil fuels. Instead, we need to develop many different technologies that would satisfy wide range of geographical and economical requirements. Biogas production from microalgae may become such a site-specific technology. This paper gives a brief list of different approaches to energy production from microalgae and describes the main economic and technological challenges for biogas production from microalgae. Moreover, an European project “Renewable energy production through microalgae cultivation: Closing material cycles (ALGAENET)” that is currently being jointly executed by partners in the Czech Republic (ICT Prague), Spain and Chile.

Keywords: biogas, anaerobic sludge, bioreactor, microalgae

OBSAH

Úvod	81
Chvátalová K., Frébort I.: Zpráva z kongresu	82
Rimpelová S., Ruml T.: Od mikroskopie k nanoskopii	83
Boháčová M., Pazlarová J.: Biofilmy	84
Kvasničková E.: Problematika infekcí kloubních implantátů	87
Kolek J.: Fermentační výroba bio-butanolu: současný stav a výzkum využití alternativních substrátů	90
Sovová T., Ovesná J.: Inhibice PCR a její detekce	95
Machová I., Pichová I.: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>: nepřekonatelný nepřítel	98
Podzimek T., Bartáček J.: Použití jednobuněčných řas jako substrát pro výrobu bioplynu	101

CONTENTS

Editorial	81
Chvátalová K., Frébort I.: Congress report	82
Rimpelová S., Ruml T.: From microscopy to nanoscopy	83
Boháčová M., Pazlarová J.: Biofilms	84
Kvasničková E.: Prosthetic joint infections	87
Kolek J.: Production of bio-butanol by ABE fermentation: current state and investigation of an alternative substrates	90
Sovová T., Ovesná J.: Inhibition of PCR and its detection	95
Machová I., Pichová I.: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>: unbeatable enemy	98
Podzimek T., Bartáček J.: Utilization of microalgae as a substrate for biogas production	101

REDAKČNÍ RADA

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. Martina Nováková, Ph.D., VŠCHT Praha, Technická 3, 166 28 Praha 6 (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, Albeřtův 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., Vídeňská 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. Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4
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 nevkládejte 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.

Novak Z.: Diploma Thesis, ICT 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
vydávaných v ČR platnému pro rok 2014.

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

ISSN 1210-1737

Neprodejné – jen pro členy Biotechnologických společností.

Stránky biotechnologické společnosti (www.bts.vscht.cz)
jsou archivovány Národní knihovnou ČR (www.webarchiv.cz).