

IDENTIFIKACE MIKROORGANIZMŮ POMOCÍ STATE-OF-THE-ART TECHNIKY

T. GERHARZ

LANXESS Deutschland GmbH Leverkusen, Head of Microbiology R&D in the Industrial Preservation Disinfection & Personal Care business line, Material Protection Products business unit, tanja.gerharz@lanxess.com

Mikroorganismy jsou schopny napadnout téměř každý materiál. Zodpovídají často za jeho destrukci. Ta může způsobit velké škody na budovách, ale rovněž v průmyslové výrobě. V boji proti mikrobiologicky indukovanému poškození materiálu je důležité najít příčiny a odstranit je. Jedním z kroků na tomto poli je identifikace zárodků, které se účastní tohoto zničujícího procesu. Chemický koncern LANXESS, orientovaný na speciality, k tomu ve svých laboratořích využívá moderní polymerázovou řetězovou reakci (PCR – polymerase chain reaction).

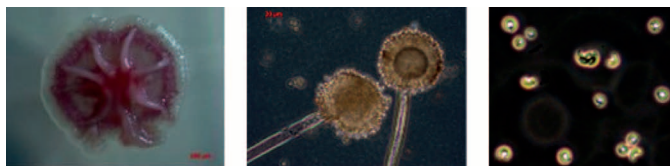
Úvod

Kdopak by to neznal: Přijdete do koupelny a vidíte černé zabarvení v štěrbínách, na silikonovém těsnění a na sprchovém závěsu. Příčinou jsou většinou plísně houby rodu *Aspergillus*, *Cladosporium* nebo *Alternaria*. Tyto plísně vytvářejí výtrusy, které jsou tmavohnědé až černě pigmentované melaninem a to vede k nehezkému vzhledu koupelny.

Mikroorganismy jako jsou například plísně, ale rovněž bakterie, mohou napadnout a rozložit téměř každý materiál. Materiály složené především z organických sloučenin jim slouží jako zdroj potravy, jsou dodavatelem energie a uhlíků. Proto mohou houby například pomocí svých vláknitých hyf proniknout do trhlin nebo pórů a tím zničit materiál mechanicky. Mikroorganismy tím velkou mírou odpovídají za poškození materiálu. Může dojít k vzniku velkých škod na stavbách a v technických systémech. Je všeobecně známo, že těmito mikroorganismy můžou být rozloženy barvy, omítka, papír a lepenky, lepidla, minerální oleje, textilie nebo dřevo. Zničeny ale mohou být rovněž produkty, u kterých se předpokládá vysoká odolnost proti mikrobiologickému rozkladu, jako jsou například beton, plasty nebo střešní tašky [1]. Proto je zjištění příčin poškození, odstranění poškození a zamezení budoucím škodám důležitým krokem v boji proti mikrobiologicky způsobenému zničení materiálu.

Pokud mají být přijata dlouhodobá opatření k ochraně materiálu, pak má informace o složení škodlivých zárodků velký význam. Účinná ochrana bude dosažena pouze tehdy, provedou-li se všechny potřebné kroky k zabránění mikrobiologickému porostu a preventivně se zabrání rozmnožení mikrobů.

Obr. 1 – Mikroskopické záznamy typických škodlivých zárodků



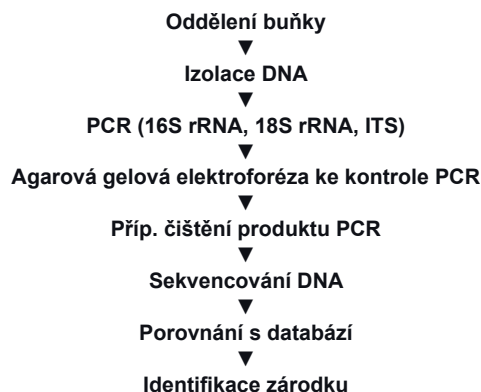
Na obr. 1 lze vidět, jak může mikroskopický průzkum odhalit, je-li materiál napaden houbami, bakteriemi nebo řasami. Mikroskopické pozorování však všeobecně neumožňuje žádnou identifikaci organismů. Konvenční mikrobiologické postupy vedoucí k identifikaci jsou založeny zpravidla na klinických zkouškách a omezují se pouze na kultivovatelné mikroorganismy, zahrnují proto pouze vybraný okruh standardních zárodků. Vychází se z toho, že v laboratorních podmínkách je kultivovatelné méně než jedno procento bakterií zahrnutých ve zkouškách [2]. Zároveň při vzniku škod na omítkách, příměších do betonu, konstrukčních plastech nebo rovněž v kovoobráběcích kapalinách zde máme dočínění se zárodky přizpůsobenými těmto materiálům. Z tohoto důvodu je nelze dostatečně identifikovat pomocí klasických postupů. Genetická metoda na základě průzkumu DNA škodlivých zárodků, nabízí kvalitativní a rovněž kvantitativní výhody identifikace téměř kompletního spektra uvedených škodlivých zárodků. Tak lze v co nejkratší době zjistit, kdo byl původcem škody.

Technologie PCR

Stejně jako u kriminálního případu zanechávají pachatelé (zde mikroorganismy) stopy na místě činu (nátěr, omítka, betonové příměši, obráběcí kapaliny, plasty, polymerní disperze) jejich specifický genetický znak, DNA, s jejíž pomocí lze vytvořit jednoznačný genetický otisk prstu a tím identifikovat pachatele. Genetický otisk prstu je individuální vzor v DNA. Na místě činu se ovšem často nalezne pouze nepatrné množství DNA, které často nestačí k tomu, aby se vytvořil genetický otisk prstu. Až další vývoj polymerázové řetězové reakce (PCR), [3, 4] vyvinuté začátkem 80-tých let americkým chemikem Kary Banks Mullisem (Nobelova cena za chemii 1993), umožnil rutinní průzkum genetických otisků prstů.

Technologie PCR má v současnosti mnoho oblastí využití. Lze ji aplikovat u všech zkoušek, které souvisí s DNA. PCR se tak mimo vytváření genetických otisků prstů používá například k identifikaci dědičných nemocí, k analýze fragmentů DNA u fosilních nálezů nebo k testům otcovství. Důležitou roli hraje rovněž v diagnostice, při rychlém zjištění a identifikaci původců chorob. Dříve trvalo několik dní, než se pomocí klasické metody získaly výsledky, jakou pacient trpí chorobou, v současnosti je to pouze několik hodin. Stejně jako u diagnostiky, je při mikrobiologickém poškození materiálu důležité znát, které mikroorganismy jsou jeho původcem.

Pomocí PCR se DNA kopíruje podobně jako na kopírce. Z jednoho fragmentu DNA můžeme pomocí PCR získat v průběhu kolem 30 „kopírovacích cyklů“ miliardu fragmentů DNA (obr. 2). DNA pak máme v dostatečné koncentraci pro sekvenci, která nám dodá genetický kód škodlivých organismů. Ten se pak porovnává z databází DNA. Sekvence DNA je určena pomocí pořadí stavebních dílů DNA (nukleotidů) v DNA a tak může být identifikován pachatel. Při identifikaci mikroorganismů se postupuje podle následujícího schématu:



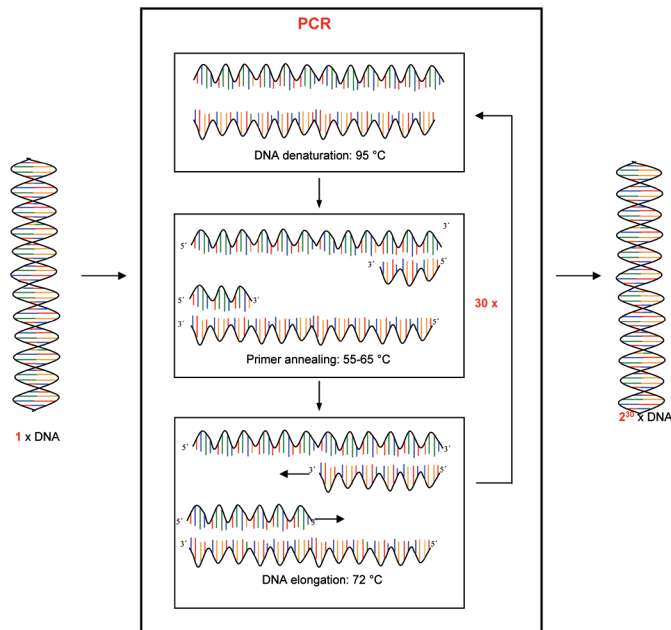
PCR

Tak, jak je znázorněno na obrázku 2, skládá se technologie PCR z neustále opakovaných kroků: denaturace DNA, svázání primerů (temperování) a natahování DNA. Při denaturaci DNA se při

Dokončení na další straně

teplotě nad 95 °C trhají vazby vodíkových můstků dvojitého helixu DNA a oba řetězce DNA se oddělí a tak se stanou přístupnými. Dalším krokem PCR je temperování a slouží k nahromadění specifických primerů. Pomocí těchto primerů mohou být tak znásobeny specifické části DNA, jako jsou 16S nebo 18S rRNA. Primery jsou krátké fragmenty DNA, které jsou specificky sekvencované, což slouží jako doplněk k identifikační sekvenci a které zobrazují startovací bod při natahování DNA. K tomu se vyžaduje optimální teplota. V posledním kroku, natahování, vyplní DNA polymeráza chybějící řetězce volnými nukleotidy. Začíná na 3. konci uloženého primeru a pokračuje po řetězci DNA

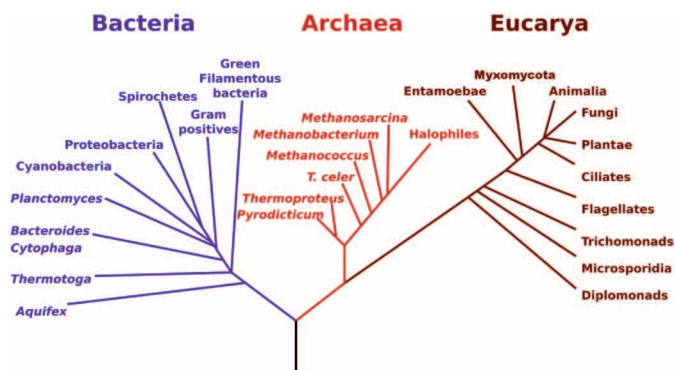
Obr. 2 – Princip polymerázové řetězové reakce (PCR)



Proč se používá gen rRNA jako prostředek k identifikaci?

Ribozomální RNA byla pravděpodobně součástí prvních živých jednotek na Zemi a tím pádem předchůdcem všech současných živých organizmů. Patří k základní výbavě všech současných živých buněk. Současně má ve všech organizmech stejnou funkci. Ukázalo se, že většinu mikroorganismů lze identifikovat na základě specifické sekvence jejich genu 16S nebo 18S rRNA. Pracuje se především se 16S rRNA prokaryontů (bakterie, kyanobakterie), [5, 6, 7, 8] a 18S rRNA eukaryontů (houby, kvasinky, řasy), [9, 10]. RNA je však nestabilní molekula a její analýza je technicky náročná. DNA je výrazně stabilnější než RNA a snadněji se s ní manipuluje. Z tohoto důvodu se v praxi nesekvencuje rRNA, ale části DNA, které tuto rRNA kódují. Hledaná sekvence rRNA je přirozeně doplněk k sekvenci DNA. Gen rRNA má vysoce konzervativní oblasti, tady oblasti, které jsou pro mikroorganismy téměř identické a proto jsou ideální k rozmnožování pomocí PCR.

Obr. 3 – Fylogenetický rodokmen založený na sekvencích rRNA



Gen rRNA má však rovněž různé variabilní oblasti, které umožňují rozdělení rodiny, rodu – genus, druhu – species a kmene. Sekvenční databáze pro geny rRNA jsou v současnosti nejrozsáhlejší. Pomocí sekvencí rRNA lze zjistit rovněž příbuzenské vztahy. Zatímco se dřívější rodokmeny organizmů zakládaly na morfologických vlastnostech, jsou založeny dnešní fylogenetické rodokmeny (viz obr. 3) na sekvencích genů rRNA. Čím je sekvence genů rRNA podobnější, tím více jsou si organizmy příbuzné.

Databáze – porovnání a identifikace jádra

Sekvence DNA produktu PCR může být identifikována pomocí tzv. postupu „BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) a přidělena určitému druhu. Přitom se porovnává sekvence DNA fragmentu genu se všemi dostupnými sekvencemi, které se nacházejí v databázi. Výsledek se skládá ze sekvencí dostupných v databázi, které jsou úplně nebo částečně homologické k zadané sekvenci. Na základě identické sekvence (při existenci 100 % homologie) může být zárodek identifikován až po druh. Pokud by žádná ze zobrazených sekvencí nebyla 100 % identická se sekvencí DNA zárodku, může být podle stupně homologie proveden odhad o taxonomickém původu, to značí příbuzenské vztahy organismu k jiným známým zárodkům. Naleznou-li se jedna nebo více identických sekvencí, může být taxonomický původ sekvence jednoznačně potvrzen. Při několika identických sekvencích se ve většině případů jedná o rozdílné rodokmeny stejného druhu. Výsledek je ovlivněn dostupností a kvalitou referenčních sekvencí v databázích. Proto není vždy možná charakterizace izolátu až po druh.

Výsledek a výhled

Od vývoje PCR kolem roku 1983 se stala identifikace bakterií ale rovněž kvasinek a hub na základě jejich genetických znaků mnohem jednodušší. Proto se stala velmi důležitou vyšetřovací metodou. PCR má výhodu ve velmi rychlém dosažení výsledku, nevýhoda spočívá v tom, že se dají identifikovat pouze známé kmeny; problém, který se vyskytuje i při klasické mikrobiologii, zde však v mnohem složitější formě.

Pomocí Real Time PCR lze prokázat existenci zárodků rovněž kvantitativně. I tato metoda se zakládá na principu PCR. Dodatečně je však možná kvantifikace pomocí fluorescenčního označení DNA. K tomu ale musí být známý profil pachatele. Když ale například víme, že skupina organizmů, jako jsou pseudomonády, může způsobovat nekonečné problémy, lze k tomuto účelu použít specifický primer. Tímto způsobem můžeme rychle zjistit, jestli vzorek obsahuje pseudomonády, a pokud se tam tyto nacházejí, tak v jaké koncentraci. Lze rovněž zjistit, jestli se přitom jedná právě o druh *Pseudomonas aeruginosa*.

Pomocí metody otisků prstů můžeme zjistit na základě genů 16S nebo 18S rRNA strukturu a dynamiku mikrobiologických živých společenství. Analyzují se zde celá živá společenství a nejen výše popsané samostatné zárodky. Denaturované gradientní gelové elektroforézy (DGGE) jsou rovněž metodou otisků prstů [11]. Tato může být použita pro zjištění změn složení příslušného druhu a ve vztahu k ročním obdobím. Je to obzvlášť zajímavé k určení charakteristických znaků živých společenství poškozujících materiál. Výsledkem mohou být identifikace vlastností materiálu v závislosti na čase a pojmenování prostorově a časově asociované mikroorganismy.

Aby se mikroorganismy rychle a cíleně identifikovaly, v laboratorních ochrany materiálu firmy LANXESS je tato technologie rutinně využívána. Zjistí-li se při provádění auditu podnikové hygieny v průmyslovém zařízení kontaminace, je naším velkým zájmem zjistit, který druh zárodků tuto kontaminaci způsobil. Technologie PCR je vysoce efektivní vyšetřovací metodou, která umožňuje dosažení velmi rychlého výsledku. Je-li identifikován škodlivý organizmus, lze vytvořit účinnou ochranu prostřednictvím vhodné kombinace biocidů ze sortimentu produktů Preventol®. Firma LANXESS navazuje těmito produkty na vysloveně širokou paletu biocidních

účinných látek s různými fungicidními, algicidními nebo antibakteriálními účinnými mechanizmy, které lze používat rovněž v jejich kombinacích.

Literatura

- [1] H. Brill, Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz, Gustav Fischer Verlag Jena, Vol 1, pp. 1-290 (1995)
- [2] R. I. Amann, W. Ludwig et al., Microbiol Rev, 59, pp. 143-69. (1995)
- [3] K. B. Mullis, F. A. Faloona, Methods Enzymol, 155, pp. 335-350 (1987)
- [4] K. B. Mullis, Ann Biol Clin (Paris), 48 (8), pp. 579-582 (1990)
- [5] E. C. Bottger, FEMS Microbiol Lett, 65, 171-176 (1989)
- [6] D. Harmsen, H. Karch, ASM News, 70, pp. 19-24 (2004).
- [7] C. P. Kolbert, D. H. Persing, Curr Opin Microbiol, 2, 299-305 (1999)
- [8] S. A. Wood, D. Mountfort et al., Appl Environ Microbiol, 74 (23), pp. 7243 – 7251 (2008)
- [9] M. A. Innis, D. H. Gelfand et al., "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics". PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Vol 1, pp. 315 -324 (1990)
- [10] S. D. Atkins, I. M. Clark, J Appl Genet, 45 (1), pp. 3-15 (2004)
- [11] G. Muyzer, Curr Opin Microbiol, 2 (3), pp. 317 - 322 (1999)

Abstract:

IDENTIFYING MICROORGANISMS USING STATE-OF-THE-ART TECHNIQUES

Summary: *Microorganisms are capable of attacking virtually all materials and are often responsible for their destruction. This can cause major damage not only to buildings, but also in industrial processes. Finding and eliminating the causes and preventing future destruction are vital measures in the fight against*

the microbially induced destruction of materials. One step in this fight is the identification of those microorganisms that are involved in this destruction process. In its materials protection laboratories, the specialty chemicals group LANXESS uses the polymerase chain reaction (PCR technology) for this purpose.