

## MIKROBIÁLNÍ POPULACE V BIOPLYNU

Jiřina Čermáková, Daniel Tenkrát, Jakub Mrázek, Kateřina Fliegerová

*Tento příspěvek se zabývá studiem mikrobiální populace v bioplynu pomocí metody založené na molekulární genetice, která dokáže identifikovat větší množství mikroorganismů než pomocí klasické kultivace. V bioplynu z čistírny odpadních vod bylo nalezeno téměř 8 mil. bakterií v m<sup>3</sup> a nejvíce byly zastoupeny dva kmény Firmicutes a Proteobacteria. Avšak mnohé mikroorganismy v bioplynu jsou dosud neznámé nekultivované bakteriální druhy. Studium bakteriální biodiverzity v bioplynu hraje klíčovou roli zejména při konečném využití bioplynu, protože některé druhy mohou způsobovat korozi zařízení či potrubí nebo mohou být dokonce patogenní a využívat bioplyn ke svému šíření.*

Klíčová slova: bioplyn, mikrobiologie, PCR

### ÚVOD

Bioplynové stanice slouží ke komerční výrobě obnovitelné energie ve formě bioplynu, který lze použít pro kombinovanou výrobu tepla a elektrické energie v kogeneračních jednotkách či k úpravě na náhradní zemní plyn. Bioplyn vzniká anaerobní fermentací organického materiálu za přítomnosti anaerobních mikroorganismů, které ovlivňují jeho složení. Část mikroorganismů z fermentovaného kalu je strhávána proudem bioplynu a může se dostat až do místa konečného využití bioplynu. Klasické zemědělské bioplynové stanice, ani čistírny odpadních vod (ČOV) nevyžadují speciální úpravu substrátu, který může obsahovat nežádoucí mikroorganismy (např. oportunní patogeny).[1,2] S velkým rozvojem bioplynových stanic tedy vyvstává otázka potenciálního rizika šíření mikroorganismů bioplynem. Tento příspěvek se zabývá monitorováním mikrobiální populace v bioplynu.

Množství a typy mikroorganismů ve fermentoru závisí jednak na druhu zpracovávaného materiálu, ale také na použitém fermentačním režimu. Celkový počet mikroorganismů ve fermentační biomase je přibližně  $1 \cdot 10^{18} \cdot \text{g}^{-1}$ , zatímco v bioplynu se počty pohybují v rozmezí  $2 \cdot 10^4 - 2 \cdot 10^7 \cdot \text{m}^{-3}$  (přibližně stejné množství jako ve vzduchu). Z těchto dat vyplývá, že přibližně jedna bakterie ze 100 milionů přejde z fermentovaného substrátu do bioplynu. Mikroorganismy v bioplynu nejsou jen naředěnou formou mikroorganismů z fermentoru, ale vykazují značné nesrovnalosti, které jsou způsobeny rozdílnými vzorci chování jednotlivých mikroorganismů. Jejich chování lze rozdělit do tří skupin; první skupinu představují mikroorganismy, které pasivně (náhodně) přecházejí do bioplynu. Mezi pasivní kmény patří Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes a Synergistes, jejichž množství závisí na typu bioplynu, např. ve skládkovém se téměř nevyskytují a naopak v hojném počtu jsou zastoupeny v bioplynu z ČOV, což je především způsobeno opětovným použitím odpadní vody, ve které jsou zachyceny. Druhou skupinu tvoří negativně aktivní mikroorganismy, které se chtějí vyvarovat přestupu do bioplynu, které je pro ně nepřátelským prostředím. Jedná se např. o Deltaproteobacteria, Spirochates, Thermotogae nebo sulfát-redukující bakterie. Třetí skupina představuje mikroorganismy, které přednostně přecházejí do bioplynu. Tento přechod používají ke svému šíření a v bioplynu se tedy vyskytují ve významně vyšších koncentracích než ve fermentoru. Jedná se zejména o Alfa, Beta a Gamaproteobacteria.[3]

### METODY STANOVENÍ

Klasická mikrobiologie, založená na kultivaci, dokáže izolovat méně než 20 % mikroorganismů přítomných ve fermentoru. Pro zbývajících více než 80 % nebyli dosud nalezeny vhodné kultivační substráty nebo izolační postupy. Informace o těchto mikroorganismech mohou poskytnout metody molekulární genetiky založené na analýze nukleových kyselin, např. polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického Polymerase Chain Reaction), kvantitativní PCR (Real-time PCR), DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza), klonování a sekvenční analýza.

### PCR

Hlavní výhodou PCR je její vysoká citlivost. Pro namnožení určité sekvence stačí velmi malé množství DNA, které probíhá ve třech krocích. Prvním krokem je krátké zahřátí celé směsi na teplotu 94 – 96 °C, při které dochází k porušení vodíkových můstků a k oddělení řetězců DNA. Druhým krokem je ochlazení směsi na 50 –

65 °C, které umožňuje krátkým oligonukleotidům DNA (tzv. primerům) se navázat na cílovou DNA vodíkovými můstky podle pravidel komplementarity. Primery ohraničují začátek a konec úseku DNA, který má být amplifikován. Ve třetím kroku (při teplotě 72°C) dochází k samotné syntéze nové DNA k původní molekule DNA. Výsledkem je dvojnásobné množství DNA. Tyto kroky se cyklicky opakují a pro dostatečné namnožení požadovaného fragmentu obvykle postačuje 30 cyklů.[4]

Separace namnožených fragmentů DNA probíhá pomocí gelové elektroforézy (DGGE, z anglického denaturing gradient gel electrophoresis), která je založena na klesající pohyblivosti fragmentů v polyakrylamidovém gelu. Pohyblivost závisí na počtu vodíkových můstků, tedy na typu, rozmístění a poměru bází, nikoliv na délce (úseky namnožení DNA jsou stejně dlouhé). V praxi to znamená, že DNA putuje v elektrickém poli až do okamžiku, kdy se oba řetězce DNA začnou od sebe oddělovat. Řetězce v místech bohatých na AT páry se snáze oddělují, zatímco úseky bohaté na CG jsou stabilnější a dojdou dále. Počet pruhů vzniklých na gelu značí počet dominantních druhů mikroorganismů ve vzorku.[5] Získané pruhy jsou z gelu vyříznuty, přečištěny a opět namnoženy pomocí PCR s fluorescenčně značenými primery. Získané sekvence jsou porovnány s databází GenBank pomocí BLASTn algoritmu.

### Real-time PCR

Real-time PCR umožňuje na rozdíl od klasické metody kvantitativní stanovení jednotlivých druhů mikroorganismů ve vzorku. Princip zůstává stejný, ale reakční směs navíc obsahuje fluorescenční barvu (nejčastěji SYBR Green), která se váže na vznikající dvouvlákně DNA. Při tom se uvolňuje fluorescence, která je zaznamenávána přístrojem. Rychlost vzniku fluorescence odpovídá množství vzniklého produktu. Kvantifikace je provedena porovnáním s jinou (kontrolní) skupinou nebo z kalibrační křivky standardu.[4]

### Vzorkování bioplynu

Pro odběr vzorků bioplynu byla vybrána čistírna odpadních vod Bubeneč, která pracuje v mezofilním režimu. K zachycení mikroorganismů byl použit nylonový membránový filtr s velikostí pórů 0,22 µm od firmy Millipor. Filtry byly lokalizovány na dvou místech, jednak přímo za fermentorem a pak za adsorpční jednotkou, která slouží k odstraňování siloxanů z bioplymu. Mimo plynných vzorků byl také odebrán vzorek kalu, ze kterého je bioplyn vyráběn. Všechny vzorky byly zmrazeny na min. -30 °C, aby nedocházelo k rozkladu mikroorganismů. Poté byly mikroorganismy stanovovány a kvantifikovány na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

### Real-time PCR

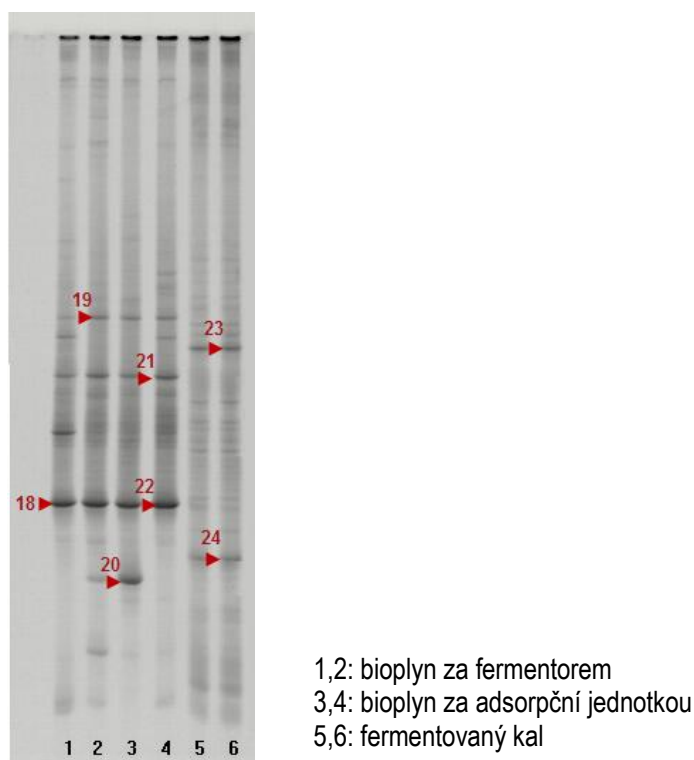
Pomocí metody real-time PCR bylo stanoveno celkové množství mikroorganismů v kalu (1,36 miliard bakterií.m<sup>-3</sup>) i v bioplynu. V bioplynu za fermentorem se vyskytovalo 7,63 mil. bakterií.m<sup>-3</sup> a za adsorpční jednotkou pouze 3,1 mil. bakterií.m<sup>-3</sup>. Tento poloviční propad je pravděpodobně způsoben částečným zachycením mikroorganismů jednak v chladičím zařízení plynu, který je umístěn před adsorpční jednotkou, ale také samotným záchytem na aktivním uhlí v adsorbéru. V bioplynu byly nalezeny 4 rody mikroorganismů (tab. 1). Nejčetněji byl zastoupen rod *Desulfovibrio* redukující sulfáty a síru na sulfan, který s vodou vytváří kyselé prostředí a zvyšuje riziko vzniku koroze. Ke vzniku koroze také přispívají mikroorganismy druhu *Clostridium leptum*, které se podílí na kyselinotvorné fázi v procesu fermentace.[5] Nejméně zastoupeným, ale potenciálně nejzajímavějším rodem jsou *Enterobacteriaceae*, které v procesu fermentace štěpí cukry a redukují dusičnany na dusitany. *Enterobacteriaceae* představují rozsáhlou skupinu zahrnující různé druhy patogenů, jako např. *Salmonella*.

Tab. 1 Množství a druh mikroorganismů v bioplynu

Druh/vzorek	Bioplyn za fermentorem [mil. bakterií.m <sup>-3</sup> ]	Bioplyn za adsorpční jednotkou [mil. bakterií.m <sup>-3</sup> ]
Celkem buněk	7,630	3,100
C.leptum	1,900 (24,9 %)	0,578 (18,6 %)
Desulfovibrio	3,230 (42,3 %)	ND
Faecalibacterium	ND	0,470 (15,2 %)
Enterobacteriaceae	0,043 (0,6 %)	0,037 (1,2 %)
Ostatní	2,457 (32,2 %)	2,015 (65 %)

### PCR + DGGE

Vytvořený DGGE profil ukazuje jednotlivé bakteriální druhy přítomné v bioplynu a ve fermentoru a dokazuje, že kal obsahuje odlišné druhy mikroorganismů oproti bioplynu (obr. 1). Bandy označené v gelu čísly byly z gelu vyříznuty a nasekvenovány. Všechny získané sekvence byly porovnány se známými sekvencemi v GenBank databázi a vykazovaly minimálně 93 % shodnost. Jednotlivé druhy jsou detailněji popsány v tab. 2. Nejčastěji byl zastoupen kmen Proteobacteria.



Obr. 1 DGGE profil bioplynu a fermentovaného kalu z ČOV Bubeneč

Tab. 2 Popis jednotlivých druhů mikroorganismů z DGGE [6,7,8]

Vzorek	Název	Shoda [%]	Klasifikace	Specifikace
18, 22	E.coli	100	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae;	ze střevní mikrolóry, může produkovat toxiny

19	Pseudomonas sp.	95	Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae	redukují dusičnany na dusitany, oportunní patogen
20	Leucobacter sp.	93	Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Micrococcineae; Microbacteriaceae	-
	Mycetocola			-
21	Butyvirbio sp.	99	Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Lachnospiraceae	ze střevní mikroflóry, štěpí celulózu
	Pseudobutyvirbio ruminis			
23	Uncultured Bacteroidetes bakterium	99	Bacteroidetes	produkuje směs kyselin (kys. propionová, mléčná, octová), může způsobovat infekce
24	Uncultured beta proteobacterium	99	Proteobacteria; Betaproteobacteria	typický pro odpadní vody (ČOV)
-	Sphingomonas sp.	99	Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Sphingomonadales; Sphingomonadaceae	štěpí polysacharidy, aerobní druh, může způsobovat infekce

### ZÁVĚR

Pomocí metod molekulární biologie bylo zjištěno, že bakterie jsou schopny přecházet do bioplynu a jejich množství je přibližně stejné jako mikrobiální znečištění vzduchu (cca. 8 mil.m<sup>-3</sup>). Podle našich výsledků nejčastěji do bioplynu přestupují zástupci dvou bakteriálních kmenů, a to Proteobakterií a Firmicutes. Některé druhy mikroorganismů vykazují škodlivé účinky na lidský organismus a jiné například zvyšují riziko koroze. Mnohé, a v bioplynových fermentorech je to většina, druhy mikroorganismů nejsou dosud rozeznány a popsány, tudíž není znám ani jejich význam ve fermentačním procesu a jejich vliv na okolí. S lepším porozuměním mikrobiální populace v bioplynu lze zamezit korozi potrubí a zařízení či případnému šíření patogenních mikroorganismů.

### PODĚKOVÁNÍ

Experimentální práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 25/2010), podporována Národní agenturou pro zemědělský výzkum (grant č. QI92A286/2008) a doktorandským grantem Grantové agentury České republiky (grant č. P503/10/P394).

### POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GANTZER C., GASPARD P., GALVEZ L., Huyard A., DUMOUTHIER N.: Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge, *Water Res*, 2001, 37763 - 70
- [2] SAHLSTRÖM L., ASPAN A., BAGGE E., DANIELSSON-THAM ML., ALBIHN A.: Bacterial pathogen incidence in sludge from Swedish sewage treatment plants, *Water Res*, 2004, 1984 – 89
- [3] MOLLETA M., DELGENES JP., GODON JJ.: Differences in the aerosolization behavior of microorganism as revealed through their transport by biogas, *Science of the Total Environment*, 2007, 75 – 88
- [4] MALIK S., BEER M., MEGHARAJ M., NAIDU R.: The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Env. International* 34, 2007, 265 - 276
- [5] ZHU XY., LUBECK J., KILBANE JJ.: Characterization of microbial communities in gas industry pipelines, *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 5354 – 5363
- [6] [http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bovine\\_Rumen](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bovine_Rumen), staženo dne 14. 11. 2010
- [7] ATLAS RM.: Principles of microbiology, Dubuque: McGraw-Hill, 1997, ISBN 0-8151-0889-3
- [8] <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Sphingomonas>, staženo dne 14. 10. 2010