

MIKROORGANISMY IMOBILIZOVANÉ UVNITŘ ANORGANICKÝCH NOSIČŮ

GABRIELA KUNCOVÁ^a a JOSEF TRÖGL^b

^a Ústav chemických procesů AV ČR, v.v.i., Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, ^b Katedra technických věd, Fakulta životního prostředí, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Královská Výchovina 3132/7, 400 96 Ústí nad Labem
kuncova@icpf.cas.cz, josef.trogl@ujep.cz

Došlo 9.12.10, přijato 3.2.11.

Klíčová slova: imobilizace, enkapsulace, anorganické polymery, sol-gel, fyziologie mikroorganismů

Obsah

1. Úvod
2. Imobilizace mikroorganismů do anorganických nosičů
 - 2.1. Metoda sol-gel
 - 2.2. Imobilizační postupy
3. Fyziologie imobilizovaných mikroorganismů
 - 3.1. Stresy v průběhu imobilizace
 - 3.2. Dlouhodobé stresy a přežívání imobilizovaných mikroorganismů
4. Využití a budoucnost živých bio-anorganických kompozitů

1. Úvod

Na živou mikrobiální buňku můžeme pohlížet jako na mikroreaktor, který spotřebovává substrát, produkuje určité látky i sám reguluje tyto své funkce. Živé buňky izolované ze svého přirozeného prostředí jsou zranitelné. V přírodě mikroorganismy zvyšují svoji odolnost proti působení nepříznivých chemických a fyzikálních podmínek vytvářením biofilmů, zachycením na povrchu kamenů a dřeva, tvorbou shluků nebo opouzdřením organickým či anorganickým materiálem. Mikroorganismy žijící v biofilmu mohou mít podstatně odlišné vlastnosti od těch, které volně plovou. Husté a ochraňující prostředí filmu jim dovoluje spolupracovat a vzájemně se ovlivňovat. Jedna z výhod tohoto prostředí je zvýšení odolnosti proti detergentům a antibiotikům, ke kterému dochází díky extracelulárním látkám a vnější vrstvě buněk, která chrání vnitřek komunity.

Pro průmyslové aplikace mikroorganismů a konstrukce celobuněčných biosenzorů je potřeba dosáhnout vysoké koncentrace buněk v určitém místě v krátkém čase, což může být provedeno zachycením (entrapment)

a opouzdřením (enkapsulace) buněk v polymerní síti. Tyto techniky imobilizace byly rozvinuty především pro přírodní a syntetické organické polymery, například alginát nebo polyvinylalkohol (PVA), a v posledních letech i pro anorganické a organicko-anorganické materiály. Ty mají na rozdíl od organických polymerů některé unikátní vlastnosti, jako je chemická odolnost, optická propustnost a biokompatibilita^{1–3}.

Imobilizace enzymů, protilátek a živých i mrtvých buněk a jejich částí má už své nezastupitelné místo v bioanalytických metodách^{4,5} a biotechnologiích^{6–8}. Mezi hlavní výhody imobilizace patří možnost opakovaného použití zpravidla drahého biologického materiálu, snadnější manipulace při jeho dávkování a izolaci produktů nebo zvýšení odolnosti biomateriálu^{9–11}.

Anorganické a organicko-anorganické materiály, jako jsou jíly nebo poly(dimethylsiloxan), byly dosud využívány převážně jen jako stabilní nosiče, na jejichž povrch jsou enzymy a živé buňky zachycovány adsorpcí. Na rozdíl od enkapsulace a entrapmentu lze adsorpcí vázat méně buněk a proces imobilizace obvykle trvá déle a je hůře kontrolovatelný³.

Byla publikována řada přehledných článků věnovaných enkapsulaci a entrapmentu biologického materiálu obecně^{2, 12–16}, biomolekul^{4, 17–20} a buněk^{3, 21–24} do anorganických nosičů. Tyto práce však diskutovaly především složení nosičů a důsledky stěsnání molekul proteinů; mnohem méně pozornosti bylo věnováno fyziologickému stavu imobilizovaných buněk, samotnému imobilizačnímu procesu a operační stabilitě bio-anorganického kompositu³.

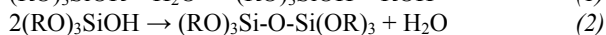
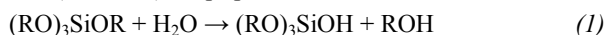
Tento text podává přehled o enkapsulaci/entrapmentu živých mikroorganismů do anorganických polymerů se zaměřením na imobilizační techniky a fyziologii imobilizovaných mikroorganismů.

2. Imobilizace mikroorganismů do anorganických nosičů

2.1. Metoda sol-gel

Většina technik enkapsulace mikroorganismů, a to jak do organických, tak i anorganických nosičů, je založena na gelaci solu (koloidní směs nanočástic), do kterého jsou přidány živé buňky ve vhodném médiu nebo pufru. V současné době jsou výrazy „sol-gel materiál“ nebo „sol-gel proces“ používány hlavně v souvislosti se syntézou anorganických materiálů z roztoků organokovových sloučenin, ke kterým se počítají organicko-anorganické materiály označované jako ORMOSIL (cit.^{25,26}), CERAMER a ORMOCER® (cit.^{2,3,13,24,25,27–29}).

Sol-gel proces byl původně vyvinut pro přípravu speciálních druhů anorganických skel, které nelze připravit tavením směsi příslušných oxidů. Při sol-gel procesu jsou prekurzory oxidů, obvykle alkoxidy, rozpuštěny v alkoholu nebo jiném organickém rozpouštědle a smíchány. Následuje jejich kyselá nebo zásaditě katalyzovaná hydrolyza, kondenzace a polykondenzace vzniklých hydroxylových skupin, která vede ke tvorbě gelu. Nejpoužívanějšími prekurzory jsou tetramethoxysilan (TMOS) a tetraethoxysilan (TEOS). Katalyzovanou hydrolyzou prekurzorů ve vodě za přítomnosti společného rozpouštědla (vody a prekurzoru) se tvoří silanolové skupiny, které dále reagují za tvorby siloxanů (viz rovnice (1)–(3)). Nakonec kondenzací silanolů a siloxanů vzniká křemičitý gel, který dále prochází procesem stárnutí a sušení. Výsledný materiál je tvořen propojenou pevnou sítí s póry menšími než 1 mm a polymerními řetězci, jejichž průměrná délka je více než jeden mikrometr^{29,30}. Dalším tepelným zpracováním (> 400 °C) lze připravit oxidová skla.



Mezi obvykle používané katalyzátory patří HCl, NH₃, KOH, NaOH, aminy, kyselina octová a KF. Rychlost a rozsah hydrolyzy jsou nejvíce ovlivněny koncentrací katalyzátoru a jeho silou (ve smyslu teorie kyselin a zásad). Slabší kyseliny obvykle vyžadují delší čas k dosažení stejného rozsahu reakce než kyseliny silné. Při použití kyselých katalyzátorů za nižší teploty vznikají spíše delší a méně rozvětvené řetězce za vzniku souvislého gelu. Oproti tomu při zásadité katalýze jsou tvořeny shluky z kratších rozvětvených molekul³⁰. Následné sušení hydrogelů snižuje porozitu, zvyšuje stlačení a omezuje difuzi.

Sol-gel proces, tak jak byl vyvinut pro přípravu speciálních skel, zahrnuje velké změny pH a vysoké koncentrace alkoholu. Oba tyto faktory mají obvykle negativní vliv na živé buňky. Sol-gel přechod musí být prováděn za fyziologických podmínek – za použití vodného nanosolu, po

kterém následuje jen mírné zpevnění a sušení. Úplnou dehydrataci anorganického gelu nemohou mikroorganismy přežít. Životaschopnost enkapsulovaných buněk je ovlivněna do značné míry smrštěním nosiče, strukturou pórů a tuhostí polymeru. Tyto faktory mohou být kontrolovány režimem sušení, obsahem zbytkové vody, přidávkem plnidel³¹, přimícháním cukrů nebo jiných rozpustných látek vymytelných za tvorby pórů³ nebo přidáním polymerů zadržujících vodu jako je PEG, alginát nebo chitosan^{3,32,33}.

2.2. Imobilizační postupy

V monografii³ se uvádí, že do roku 2009 bylo enkapsulováno do anorganického, převážně křemičitého, nebo organicko-anorganického nosiče více než 30 kmenů mikroorganismů, a to jak přirozených, tak i geneticky upravených. Po prvních úspěšných enkapsulacích živých kvasinek do křemičitého gelu, které byly popsány v roce 1981 P. Rouxhetem³⁴ a v roce 1989 G. Carturanem³⁵, byly sol-gel postupy použity v mnoha laboratořích na celém světě. Enkapsulace *Escherichia coli* a rozsivek, které samy tvoří křemičité skořápky, do anorganické a organicko-anorganické matrice byla od devadesátých let minulého století systematicky studována skupinou profesora J. Livage. Bioremediace a biotechnologické aplikace mikroorganismů v anorganickém nosiči jsou předmětem dlouholetého výzkumu skupiny profesora H. Böttchera.

Dosud vyvinuté techniky imobilizace mohou být rozděleny do deseti základních skupin. V tabulce I jsou seřazeny od metod napodobujících přípravu skel, které jsou využívány zejména pro enkapsulace enzymů, až po autoenkapsulace buněk s vnesenými geny pro expresi silicateinu^{3,36}.

První krok postupu I je kyselá katalyzovaná tvorba částečně kondenzovaných oligomerů (dále označovaná jako předpolymerace) komerčně dostupných alkoxysilanů (TEOS, TMOS), která probíhá bez přítomnosti organických rozpouštědel. Ve druhém kroku je upraveno pH přidáním pufru nebo zásady na fyziologičtější hodnoty

Tabulka I

Metody enkapsulace živých mikroorganismů do anorganických polymerních nosičů

Typ	Metoda enkapsulace	Lit.
I	do předpolymerovaných alkoxysilanů	33-35, 37, 38, 64, 65
II	do křemičitého nosiče bezalkoholovým postupem	10, 11, 15, 39-45, 66, 67
III	suché anorganické biokompozity a enkapsulace gelací zmrazením (BIOCER)	7, 46-48, 68-70
IV	do anorganických nosičů modifikovaných organickými látkami	16, 33, 49-54
V	do nosičů připravených z organicky modifikovaných alkoxysilanů	20, 43, 55-57
VI	nanášením oxidu křemičitého z plynné fáze (BIOSIL)	22, 58
VII	anorganická membrána na obalech předimobilizovaných buněk	7, 22, 59
VIII	do nosičů na bázi oxidů železa ^{49, 62} , titanu ⁶¹ , zirkonia ⁶¹ a hliníku ⁶⁰	49, 60-62
IX	buňkami řízené seskupení anorganických nanočástic (CDA)	9, 23, 71
X	autoenkapsulace transformovaných mikroorganismů	36, 63

(pH \approx 7). Po smíchání se suspenzí mikroorganismů dochází ke gelaci solu během několika minut. Dvoustupňový proces eliminuje škodlivý vliv kyseliny, ale zůstává negativní vliv alkoholu, který se uvolňuje při polykondenzačních reakcích a stárnutí gelu^{3,33,37,38}.

S cílem zlepšit biokompatibilitu procesu byly vyvinuty postupy (II), při kterých je alkohol odstraněn ze solu odpařením za vakua^{15,39–42} nebo probubláváním inertním plynem^{10,11,39,40}. Pro bezalkoholovou enkapsulaci byly také využity komerční roztoky vodního skla a koloidní kyseliny křemičité (LUDOX)^{40,41,43,44}. Vyšší biokompatibilita bezalkoholových postupů byla prokázána⁴⁵, nicméně výsledné gely jsou ve srovnání s postupy I méně mechanicky soudržné a méně transparentní³.

Při přípravě suchých biokompozitů gelací zmrazením (III) nejsou buňky poškozovány kyselým prostředím ani alkoholem. Suspenze buněk, aditiv a keramického prášku je nalita do formy a prudce zchlazena na teplotu pod -40 °C, při které koloidní disperze přechází ireverzibilně na gel. Vzniklý monolit je pak lyofilizován⁷. Podíl přeživších mikroorganismů je při tomto postupu⁷ nízký (≤ 1 %). Dílčího zlepšení bylo dosaženo přidávkem živin, kryoprotektantů a optimální rychlostí chlazení. Stupeň přežití *Rhodococcus ruber* byl zvýšen z 0,9 % na 6,1 % přidávkem trehalosy⁴⁶, přičemž buňky přežily především na povrchu. Tyto keramické biokompozity (III), které jsou někdy označovány názvem BIOCER, jsou pevné robustní monolity, ze kterých může být vytvořena náplň velkých reaktorů, která je dlouhodobě stabilnější než sypané kolony. Po rehydrataci se přeživší mikroorganismy mohou pomnožit, inokulovat reaktor v celém jeho objemu a zahájit biotechnologický proces^{47,48}.

Jako postup IV souhrnně označujeme postupy I, II, III a VIII vylepšené o přidavek organických látek a to jak nízkomolekulárních, tak přírodních nebo syntetických polymerů. Nízkomolekulární látky jako je glycerol, glukosa a další cukry, které jsou často zdrojem uhlíku pro enkapsulované mikroorganismy, zlepšují zejména dlouhodobou životaschopnost biokompozitů, zatímco míra přežití imobilizace zůstává nezměněna⁴⁹. Oproti tomu organické polymery zlepšují přežití imobilizačního procesu. Při enkapsulaci do směsi křemičitého solu s alginátem bylo pozorováno lepší přežití rostlinných buněk a naopak o něco zkrácená dlouhodobá životaschopnost kvasinek, která pravděpodobně souvisí s nižší porozitou kompozitního nosiče^{33,50}. Systematická studie vlivu přísad syntetických i přírodních polymerů ke křemičitému nosiči při enkapsulaci *Bacillus* sp. UG-5B v náplňových reaktorech ukázala, že pro přežití buněk a jejich vysokou aktivitu je nejlepší přísada PVA a PEG ke TMOS (cit.^{51–53}). Smícháním kvasinek s TMOS v emulzi rostlinného oleje (směsi slunečnicového, sojového a řepkového) a vody byly připraveny částice biogelu o velikosti 110–175 μ m. Takto imobilizované kvasinky vykazovaly ve srovnání s volnými vyšší aktivitu i stabilitu⁵⁴.

Jinou cestou ke zvýšení biokompatibility sol-gel procesu, než je přidávání organických látek, je použití organicky modifikovaných prekurzorů (postup V). Organokřemičité

prekurzory, u nichž byla jedna nebo dvě alkoxydové skupiny nahrazeny organickými skupinami (alkyl, 3-aminopropyl), byly použity převážně k imobilizaci proteinů. V důsledku této modifikace nosiče bylo dosaženo vyšší stability enkapsulovaného proteinu²⁰ a až stonásobné zvýšení enzymové aktivity proti volnému enzymu⁵⁵. Pro imobilizaci kvasinek byl použit glycidoxypropyltrimethoxysilan (GLYMO) v kombinaci s TEOS (cit.⁴³). Zlepšení produkce vodíku u sinic *Synechocystis* sp. PCC 6803 bylo dosaženo enkapsulací do solu složeného z MTES, TEOS a PEG (cit.⁵⁶). Mezi další prekurzory, které by mohly zlepšit životaschopnost organokřemičitých biokompozitů je možné zařadit tetrakis(2-hydroxyethyl)orthosilikát (THEOS), který je dobře rozpustný ve vodě a je kompatibilní s polysacharidy i proteiny⁵⁷.

Názvem BIOSIL je označován postup depozice oxidu křemičitého z plynné fáze (postup VI)²². Živé buňky zachycené na vláknech přírodního polymeru jsou vystaveny do proudu alkoxyilanů. Na vlhkém povrchu buněk dochází k hydrolyze a kondenzaci, zatímco vznikající alkohol je odváděn proudem plynu. U rostlinných buněk *Coronilla vaginalis* (čičorka pochvatá) enkapsulovaných tímto postupem vznikajícími nanočásticemi oxidu křemičitého, byla zvýšena aktivita metabolismu (redukce tetrazoliové soli na formazan) ve srovnání s volnými buňkami. Stejně tak i takto enkapsulované buňky *Catharantus roseus* (katarantus růžový) produkovaly více alkaloidů a *Ajuga reptans* (zběhovec plazivý) více invertasy⁵⁸.

Citlivé buňky byly chráněny proti nepříznivým vlivům enkapsulace do anorganického nosiče (předimobilizace) tak, že nejprve byly imobilizovány do přírodního polymeru (postup VII), jako je alginát. Na povrchu alginátových kuliček s buňkami byla potom vytvořena křemičitá membrána, která je dostatečně propustná pro živiny a požadované metabolity (např. inzulin)^{22,59}. U kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a mléčných bakterií *Oenococcus oeni* předimobilizovaných do alginátu došlo ke změně parametrů saturační kinetiky fermentace v závislosti na následném způsobu přípravy křemičité membrány. Obalení ponořením do vodné suspenze křemičitých nanočástic připravených kyselou hydrolyzou TEOS vedlo ke zvýšení V_{lim} při zachování K_m , tj. k prodloužení oblasti kinetiky prvního řádu. Oproti tomu u membrány připravené v proudu MTES došlo k zachování V_{lim} , ale snížení K_m , tj. oblast kinetiky nultého řádu byla prodloužena. Snížení K_m na poloviční hodnotu se připisuje vlastnostem MTES membrány, které jsou podobné silikonovému kaučuku. Tato membrána také účinněji bránila úniku kvasinek do média (< 1 % ve srovnání s 24 % pro kuličky obalované z vodné suspenze)²².

Předimobilizací do alginátu bylo zlepšeno i přežití kvasinek při enkapsulaci do keramického nosiče metodou gelace zmrazením⁷.

Kromě oxidu křemičitého byly živé buňky imobilizovány do gelů oxidů železa⁴⁹, hliníku⁶⁰, titanu a zirkonia⁶¹ (VIII). Adsorpce magnetických nanočástic na bakterie rozkládající dibenzothiofen zlepšila operační stabilitu kolonového reaktoru a magnetitem obalené bakterie byly

vyjímány z reaktoru pomocí magnetu⁶². Mikroorganismy enkapsulované do gelu hydratovaného titaničitého a zirkoničitého oxidu, byly připraveny smícháním stabilizovaného solu titaničitého a zirkoničitého prekursorů s hydrofilními ligandy. Amorfni gely oxidu titaničitého se rozpouštěly pouze v citrátovém pufru při pH 6, jinak byly vysoce chemicky stabilní a odolávaly i silným kyselinám⁶¹.

Aktivní role buněk byla využita při enkapsulaci do křemičitých nanočástic pomocí fosfolipidů (IX). Metoda označovaná CDA (Cell Directed Assembly), spočívá v seskupování prekursorů kyseliny křemičité řízeném lipidy, do kterého přítomné buňky zasahují tak, že se obklopují kapalinou za tvorby mnohavrstevnaté lipidové membrány, která je souvisle propojuje s křemičitou nanostrukturou. Tento bio-nano přechod ochraňuje buňky před nadměrným vysušením, ale nebrání přístupu malých molekul k jejich povrchu. Mnohavrstevnatý lipidový přechod vytvořený mezi buňkami a obklopující křemičitou nanostrukturou zmírňuje mechanické tlaky, a slouží vlastně jako další extracelulární membrána^{9,23}.

Rozsivky a některé mořské houby využívají strategie tvorby anorganických skořápek s hierarchickou strukturou za pomoci silaffinů, tj. proteinů s afinitou k oxidu křemičitému. Z ostnů mořské houby *Tethya aurantia* se podařilo izolovat enzym podobný katepsinu, silicatein, který katalyzuje polymeraci TEOS (cit.⁶³) a zároveň slouží jako templát při tvorbě křemičitých, ale i jiných anorganických materiálů *in vitro*³⁶. Novou cestu v enkapsulaci živých buněk do silikátových polymerů otevřelo genetické inženýrství, když se podařilo připravit geneticky modifikovanou bakterii *Escherichia coli* s genem pro produkci α -silicateinu. Ta syntetizovala polysilikáty na svém povrchu a při tom vykazovala stejnou růstovou rychlost jako bakterie bez tohoto genu³⁶.

3. Fyziologie imobilizovaných mikroorganismů

Imobilizací mikroorganismů obecně dochází ke změnám v jejich fyziologii. Nejdůležitější fyziologické změny mikroorganismů imobilizovaných do anorganického nosiče shrnuje obr. 1. Na rozdíl od imobilizace do organických polymerů jsou mikroorganismy v anorganických nosičích vystaveny silnějším stresům už v průběhu imobilizace. Anorganické nosiče jsou tuhé a mikroporézní³. Důsledkem je zpomalená difuze, která může vést k nedostatku živin³³, hromadění zplodin metabolismu a také k narušení mezibuněčné komunikace^{3,72}. Pevnost a neroztažnost anorganických nosičů způsobuje omezení pohybu i rozmnožování imobilizovaných mikroorganismů^{6,73,74}.

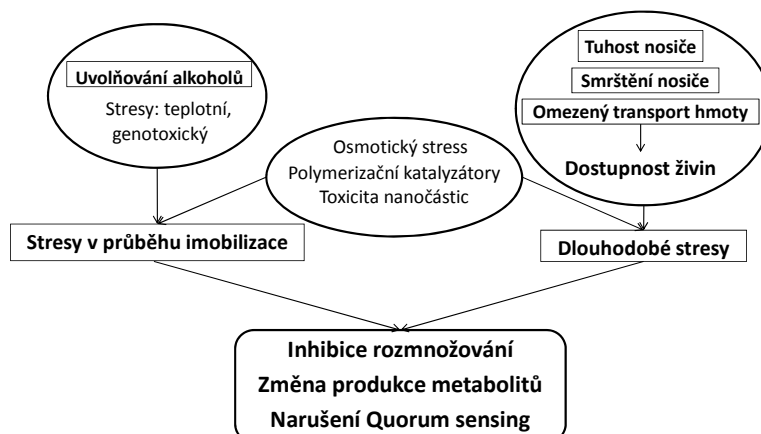
Pro sledování životaschopnosti a fyziologického stavu mikroorganismů imobilizovaných do anorganických nosičů lze využít většinu metod používaných pro volné buňky, jako je kultivační stanovení, měření spotřeby živin a kyslíku, tvorbu produktů, aktivitu enzymů a mikroskopie. Je ale třeba počítat s ovlivněním výsledků v důsledku pomalé difuze a adsorpce látek v mikroporézním nosiči. Vyšší chemická stabilita anorganických nosičů pak omezuje metody, které vyžadují jejich rozpuštění³. Naopak transparentnost nosiče je výhodná při použití optických metod.

3.1. Stresy v průběhu imobilizace

V procesech I, II, V a VIII (viz tab. I) je prvním krokem smíchání suspenze buněk s předpolymerovanými alkoxyasilany nebo s koloidním roztokem anorganických nanočástic. Prvními stresory působícími na mikroorganismy jsou tak především alkoholy uvolněné při kondenzační reakci^{24,45,75} a použitý polymerační katalyzátor³. Pomocí specifických bioreportérových bakterií^a, které reagovaly syntézou fluorescentního proteinu na konkrétní stresy, byly při imobilizaci bezalkoholovým postupem (II) v malém měřítku detegovány i teplotní a genotoxický stres^{73,74}. Nicméně není zcela jasné, zda nešlo spíše o nespecifickou odezvu na jiné stresy vzhledem k silnému metabolickému provázání stresových reakcí. V průběhu gelace postupem I pokračují kondenzační reakce a tím narůstá negativní vliv alkoholů. Zkrácení doby působení alkoholu se dosahuje zkrácením času mezi smícháním solu s buněčnou suspenzí a gelací. Proto byly živé buňky imobilizovány zejména do solu připraveného z TMOS, který ve srovnání s jinými alkoxyasilany nejspíše podléhá hydrolyze a následně polykondenzaci za pokojové teploty. Ke snížení vlivu alkoholu a katalyzátorů přispívá tvarování biogelu do tenkých vrstev, ze kterých se alkohol snadno odpařuje a také ho lze rychle odstranit ponořením do pufru krátce po gelaci³⁸. I po vytvoření gelu dochází ke změnám ve struktuře nosiče, chemické vazby zanikají a zároveň se tvoří nové, mění se velikost porů²³. Na buňky začíná působit mechanický stres, zejména pokud pokračuje sušení gelu. To je významné v postupu III, který pak přežívá zpravidla $\leq 10\%$ imobilizovaných mikroorganismů^{46,70,76}. Živé biokompozity jsou proto uchovávány ve formě vlhkého gelu, zpravidla ponořené do pufru nebo živného média³. Suché xerogely byly připraveny enkapsulací bakteriálních spor⁴⁸, které se po zvlhčení opět začaly množit^{67,77}.

Zvýšení počtu buněk přeživších proces enkapsulace bylo dosaženo přidávkou organických polymerů (postup IV), např. PEG a některých nízkomolekulárních látek jako je trehalosa a glycerol. Ne zcela jasné mechanismy jejich ochranného účinku zahrnují stabilizaci cytoplazmatické membrány a ochranu před vysušením³.

^a Bioreportéry jsou geneticky modifikované mikroorganismy nesoucí genetické fúze přirozených regulovaných metabolických drah a vložených reportérových genů. Bioreportéry produkují měřitelný signál (nejčastěji elektrochemický, luminescenční nebo fluorescenční) jako odpověď na analyt resp. skupinu příbuzných analytů⁸⁴.



Obr. 1. Změny ve fyziologii enkapsulovaných mikroorganismů způsobené stresem při imobilizaci a dlouhodobém uchování mikroorganismů v anorganickém nosiči

V průběhu procesu vytváření anorganické membrány působí na mikroorganismy nejméně negativních vlivů po jejich předimobilizaci do organického polymeru (postup VII)³ a nebo při procesech, na kterých se imobilizované mikroorganismy samy podílí (postupy IX a X)⁷⁸.

3.2. Dlouhodobé stresy a přežívání imobilizovaných mikroorganismů

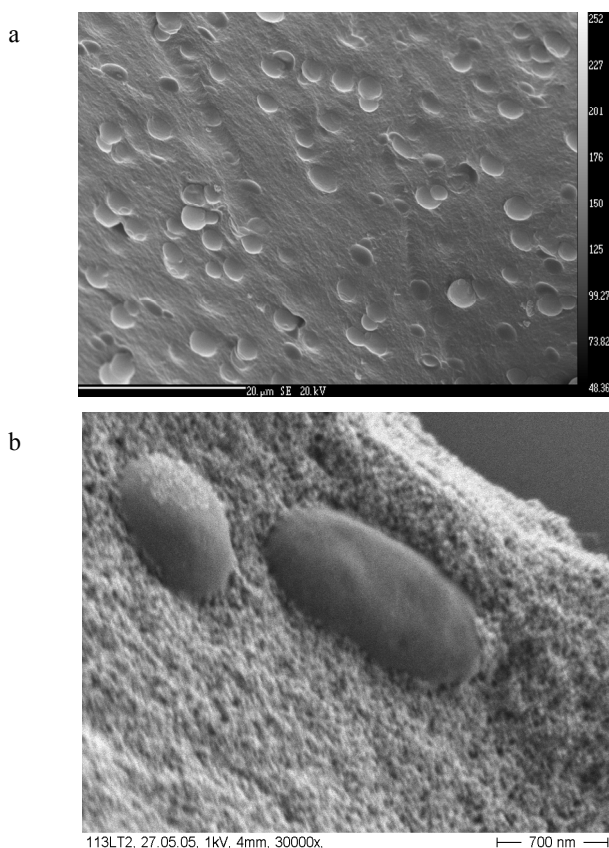
Po skončení imobilizace probíhají ve vlhkém biogelu i nadále strukturální změny, a to dlouhodobě s vlivem jak na stabilitu nosiče, tak na životaschopnost imobilizovaných mikroorganismů. Jednotlivé buňky jsou v čerstvém křemičitém nosiči oddělené, jak ukazuje obr. 2.

Základní rozdíl mezi organickými a anorganickými nosiči je v tom, že molekuly organických polymerů jsou pružná klubka, kdežto křemičité gely (a podobně i titaničité, zirkoničité, železité a hlinité) jsou složeny z nestlačitelných hydratovaných nanočástic oxidů. V organických gelech, jako je alginát nebo PVA, se mikroorganismy normálně množí a tvoří kolonie³. Mikroskopické snímky ukázaly, že v křemičitých nosičích dochází k inhibici buněčného dělení, a to zejména v hlubších vrstvách gelu, kde je mikroorganismus obklopen nosičem ze všech stran. Naopak v povrchových vrstvách, poruchách, prasklinách a v dutinách se mikroorganismy množily^{3,74}. Inhibice dělení závisí na tlaku, který je schopna dělicí se buňka vyvinout, a na tom, zda je nosič dostatečně pevný, aby tomuto tlaku odolal⁷⁹. Některé práce nicméně připouštějí i buněčné dělení uvnitř gelu, pravděpodobně ale ne v plném rozsahu za tvorby kolonií^{38,39}. To lze vysvětlit tím, že v křemičitém gelu ponořeném do pufru při pH 7

dochází pomalu k hydrataci Si-O-Si vazeb, zvětšování vzdáleností mezi nanočásticemi a tím k poklesu soudržnosti gelu, což dává mikroorganismům určitý prostor pro množení a únik do média³. Protože zatím nejsou vypracovány metody pro charakterizaci změn struktury vodných anorganických gelů, je obtížné srovnávat dlouhodobé přežití a množení buněk v živých anorganických biomateriálech připravených na různých pracovištích.

U buněk nepoškozených alkoholem nebylo pozorováno pronikání křemičitých nanočástic přes buněčnou membránu, ale byla popsána adheze nanočástic o velikosti <100 nm. V přítomnosti křemičitých nanočástic o velikosti 12,5 a 27 nm (LUDOX) docházelo ke zpomalení růstu řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*. Toxicita nanočástic byla úměrná zmenšující se velikosti částic⁸⁰.

Imobilizace mikroorganismů do anorganického nosiče zlepšila jejich odolnost proti organickým rozpouštědům^{10,11}, toxickým látkám⁸¹ a zvýšené teplotě⁸¹. Bez živin imobilizované mikroorganismy přežily déle (nebo spíše umíraly pomaleji) než volné. Jasně vysvětlení tohoto jevu nebylo dosud podáno, hypotézy diskutují ochranný vliv nosiče a inhibici mezibuněčné komunikace^{3,72}. Dokumentované doby, po které mikroorganismy prokazatelně přežily imobilizované v anorganickém nosiči, se počítají na týdny až měsíce. Horní hranice je navíc obvykle určena délkou pokusu a ne kompletním vyhynutím kultury. Aktuální „rekord“ (září 2010) pro nesporeující bakterie je 550 dní³⁹, pro bakteriální spóry pak přes 2,5 roku⁸². Klíčové faktory skutečně dlouhodobého přežití jsou dostatek živin a dostatek vody. Bez koimobilizovaných živin nebo bez pravidelné dodávky živného média zvenčí přežily imobilizované mikroorganismy maximálně několik týdnů



Obr. 2. Mikroorganismy immobilizované do tetramethoxysilanu postupem I; a) *Sacharomyces carlsbergensis* b) *Pseudomonas fluorescens* HK44

a jejich životaschopná populace průběžně klesala. Naopak s dostupnými živinami byly dosažené doby přežití v řádech měsíců i let a bylo dosaženo i zvýšení výchozí immobilizované populace^{33,37,39}.

Většina bakterií komunikuje s ostatními pomocí sekrece a detekce komunikačních látek, jejichž koncentrace pak roste s hustotou populace. V závislosti na koncentraci komunikačních molekul (a to i vlastních) pak mikroorganismus reguluje některé metabolické dráhy, včetně přechodu do stacionární růstové fáze. Tato mezibuněčná komunikace je v anorganických maticích narušena. Je to způsobeno pomalou difuzí komunikačních molekul. To může vést k tomu, že přestože se buňka nachází v husté enkapsulované populaci, je v její těsné blízkosti nízká koncentrace komunikačních molekul a buňka se proto chová jako by byla osamocená⁷². V řídké populaci může pomalá difuze způsobit lokální zvýšení koncentrace komunikačních molekul a osamocená buňka pak vykazuje hromadné chování^{71,83}. U jediné izolované immobilizované buňky *Staphylococcus aureus* se tak podařilo jen vlastními komunikačními molekulami autoindukovat přechod do virulentní fáze, spojený normálně s vyšší koncentrací bakterií⁷¹.

4. Využití a budoucnost živých bio-anorganických kompozitů

Výsledky dosažené při výzkumu immobilizace do anorganických nosičů ukazují, že tento postup fixace živých buněk je technicky schůdný a rozšiřuje možnosti nabízené tradičními postupy immobilizace do organických polymerů. Podobně jako v případě výzkumu v oblasti chemie sol-gel procesu, který probíhá již desítky let a přesto pouze několik výsledků bylo komerčně využito, nemá dosud širší než laboratorní využití. Nicméně enzymy immobilizované sol-gel postupem jsou již v nabídce firem prodávajících immobilizované enzymy⁵⁵ a tak lze předpokládat, že své uplatnění najdou i živé biokompozity.

Transparentnost a chemická stabilita anorganických nosičů je výhodná pro konstrukci celobuněčných optických senzorů, které jako biologickou rozpoznávací část využívají enkapsulované fluorescenční a luminiscenční mikroorganismy. Tenké vrstvy křemičitého gelu s enkapsulovanými bioluminescenčními bioreportéry tak byly použity k selektivní detekci znečištění polyaromatickými uhlovodíky³⁷ a BTEX (cit.⁸⁵).

Tuhost a mikroporozita anorganických nosičů napomáhá fyziologickým změnám nutným pro biochemickou produkci sekundárních metabolitů. Byly popsány produkce plynného vodíku immobilizovanými sinicemi⁵⁶, produkce prodigosinu⁸³, antibiotik⁸⁶, bílkovin a enzymů^{40, 87}, organických kyselin⁸⁸, fermentačních produktů²² nebo analyticky využitelná produkce barevných metabolitů při biodegradaci polychlorovaných bifenyly⁶⁵.

Laboratorní pokusy ukázaly, že pomocí mikroorganismů v anorganickém nosiči lze odstraňovat kontaminanty z životního prostředí, a to jak organické látky biodegradací (fenol^{46, 64}, glykol⁴⁶, kyanidy⁵⁷, azobarviva⁸¹, sloučeniny dusíku⁸⁹), tak i těžké kovy sorpcí⁹⁰.

Vzhledem k tomu, že v nemálo případech přežily mikroorganismy v immobilizovaném stavu řadu měsíců až let^{3,33,37,39,46}, je enkapsulace do anorganických nosičů alternativou k hlubokomrazícím metodám dlouhodobého uchování mikrobiálních kultur. Za hlavní přínosy lze považovat jednoduché provedení (skladování materiálu v chladničce, pouze ponořeného do vhodného pufru) a také nepropustnost nosiče pro další mikroorganismy, čímž by se uchovávaná kultura chránila před kontaminací. K dlouhodobému uchování mikrobiálních kultur by mohly sloužit i materiály připravené gelací zmrazením (postup III), kde jsou enkapsulované mikroorganismy vysušené a doba přežití se tak prodlužuje^{46,47,69}.

Křemičitý nosič, na rozdíl od většiny organických polymerů, je vysoce biokompatibilní a přitom propustný. Úspěšné postupy immobilizace mikroorganismů se proto staly východiskem pro immobilizaci savčích buněk a vývoje umělých orgánů. Transplantované buňky oddělené od ostatní tkáň křemičitou membránou by neměly vyvolávat autoimunitní reakce. Na výzkum v této oblasti, zejména pro léčení cukrovky prvního typu, jsou vynakládány vysoké finanční částky^{6,16,21}.

Silicateinem zprostředkovaná enkapsulace bakterií může zlepšit, rozšířit a optimalizovat rozsah aplikací bakterií pro produkci rekombinantních proteinů⁹¹. Lze předpokládat, že mikroorganismy chráněné vlastní vrstvou silikátů budou lépe odolávat nepříznivým vlivům okolí, kterým mohou být buňky vystaveny například v průběhu imobilizace.

Další unikátní vlastnosti buněk imobilizovaných do anorganických nosičů, mezi které patří odlišné sociální chování buněk, budou nepochybně využity v nových technologiích, které musí pro zajištění udržitelného rozvoje nahradit ty stávající, nešetrně k životnímu prostředí.

Práce byla podpořena Interní grantovou agenturou univerzity J. E. Purkyně a MŠMT České republiky (projekt ME892).

Seznam zkratk a symbolů

BTEX	benzen, toluen, ethylbenzen a xylen
GLYMO	glycidoxypropyltrimethoxysilan
K_m	Michaelisova konstanta saturační kinetiky
MTES	methyltriethoxysilan
MTMS	methyltrimethoxysilan
PEG	polyethylenglykol
PVA	polyvinylalkohol
TEOS	tetraethoxysilan
THEOS	tetrakis(2-hydroxyethyl)orthosilan
TMOS	tetramethoxysilan
V_{lim}	limitní rychlost reakce v saturační kinetice

LITERATURA

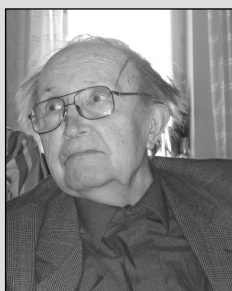
- Liu X. M., Germaine K. J., Ryan D., Dowling D. N.: *Sensors* 10, 1377 (2010).
- Gill I., Ballesteros A.: *Trends Biotechnol.* 18, 282 (2000).
- Kuncová G., Trögl J., v knize: *Handbook of Inorganic Chemistry Research*, (Morrison D. A., ed.), kap. 2, s. 53. Nova Science Publishers, New York 2010.
- Kandimalla V. B., Tripathi V. S., Ju H. X.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36, 73 (2006).
- Walcarius A., Collinson M. M.: *Annu. Rev. Anal. Chem.* 2, 121 (2009).
- Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J.: *J. Mater. Chem.* 16, 1013 (2006).
- Koch D., Soltmann C., Grathwohl G., v knize: *High-Performance Ceramics IV, Pts 1-3*, (Pan W., Gong J., ed.), s. 1683. Trans Tech Publications Inc., Zurich 2007.
- Sanchez C., Julian B., Belleville P., Popall M.: *J. Mater. Chem.* 15, 3559 (2005).
- Baca H. K., Ashley C., Carnes E., Lopez D., Flemming J., Dunphy D., Singh S., Chen Z., Liu N. G., Fan H. Y., Lopez G. P., Brozik S. M., Werner-Washburne M., Brinker C. J.: *Science* 313, 337 (2006).
- Desimone M. F., Degrossi J., D'Aquino M., Diaz L. E.: *Biotechnol. Lett.* 24, 1557 (2002).
- Desimone M. F., Degrossi J., D'Aquino M., Diaz L. E.: *Biotechnol. Lett.* 25, 671 (2003).
- Bottcher H.: *J. Prakt. Chem.* 342, 427 (2000).
- Gadre S. Y., Gouma P. I.: *J. Am. Ceram. Soc.* 89, 2987 (2006).
- Rooke J. C., Meunier C., Leonard A., Su B. L.: *Pure Appl. Chem.* 80, 2345 (2008).
- Coradin T., Livage J.: *Acc. Chem. Res.* 40, 819 (2007).
- Amoura M., Roux C., Nassif N., Livage J., Coradin T.: *Geochim. Cosmochim. Acta* 73, A38 (2009).
- Pierre A. C.: *Biocatal. Biotransfor.* 22, 145 (2004).
- Dunn B., Zink J. I.: *Acc. Chem. Res.* 40, 747 (2007).
- Tripathi V. S., Kandimalla V. B., Ju H. X.: *Sens. Actuators, B* 114, 1071 (2006).
- Mena B., Mena F., Aiolfi-Guimaraes C., Sharts O.: *Int. J. Nanotechnol.* 7, 1 (2010).
- Carturan G., Dal Toso R., Boninsegna S., Dal Monte R.: *J. Mater. Chem.* 14, 2087 (2004).
- Callone E., Campostrini R., Carturan G., Cavazza A., Guzzon R.: *J. Mater. Chem.* 18, 4839 (2008).
- Baca H. K., Carnes E., Singh S., Ashley C., Lopez D., Brinker C. J.: *Acc. Chem. Res.* 40, 836 (2007).
- Livage J., Coradin T., v knize: *Medical Mineralogy and Geochemistry*, (Sahai M., Schoonen M. A. A., ed.), kap. 10. Mineralogical Society of America, Chantilly 2006.
- Pagliari M., Ciriminna R., Man M. W. C., Campestrini S.: *J. Phys. Chem., B* 110, 1976 (2006).
- Salata O.: *J. Nanobiotechnol.* 2, 3 (2004).
- ORMOCER@s, <http://www.ormocer.de/EN/>, citováno 7.12.2010.
- Teng G. H., Soucek M. D.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 381 (2000).
- Brus J., Kotlik P.: *Chem. Listy* 92, 302 (1998).
- Brinker C. J., Scherer G. W.: *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, New York 1990.
- Fiedler D., Thron A., Soltmann U., Bottcher H.: *Chem. Mater.* 16, 3040 (2004).
- Li W. J., Yuan R., Chai Y. Q., Zhou L., Chen S. H., Li N.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 830 (2008).
- Kuncová G., Podrazky O., Ripp S., Trogl J., Sayler G., Demnerova K., Vankova R.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 31, 335 (2004).
- Rouxhet P. G., Vanhaecht J. L., Didelez J., Gerard P., Briquet M.: *Enzyme Microb. Technol.* 3, 49 (1981).
- Carturan G., Campostrini R., Dire S., Scardi V., Dealteriis E.: *J. Mol. Catal.* 57, L13 (1989).
- Brutchey R. L., Morse D. E.: *Chem. Rev.* 108, 4915 (2008).
- Trogl J., Ripp S., Kuncova G., Sayler G., Churava A., Parik P., Demnerova K., Halova J., Kubicova L.: *Sens. Actuators, B* 107, 98 (2005).
- Trögl J., Kuncová G., Kuráň P.: *Folia Microbiol.* 6, 569 (2010).

39. Alvarez G. S., Foglia M. L., Copello G. J., Desimone M. F., Diaz L. E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 639 (2009).
40. Desimone M. F., De Marzi M. C., Copello G. J., Fernandez M. M., Pieckenstain F. L., Malchiodi E. L., Diaz L. E.: *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 168 (2006).
41. Desimone M. F., De Marzi M. C., Copello G. J., Fernandez M. M., Malchiodi E. L., Diaz L. E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 747 (2005).
42. Ferrer M. L., Yuste L., Rojo F., del Monte F.: *Chem. Mater.* **15**, 3614 (2003).
43. Perullini M., Jobbagy M., Moretti M. B., Garcia S. C., Bilmes S. A.: *Chem. Mater.* **20**, 3015 (2008).
44. Gautier C., Livage J., Coradin T., Lopez P. J.: *Chem. Commun.* **2006**, 4611.
45. Coiffier A., Coradin T., Roux C., Bouvet O. M. M., Livage J.: *J. Mater. Chem.* **11**, 2039 (2001).
46. Soltmann U., Bottcher H.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **48**, 66 (2008).
47. Raff J., Soltmann U., Matys S., Selenska-Pobell S., Bottcher H., Pompe W.: *Chem. Mater.* **15**, 240 (2003).
48. Soltmann U., Raff J., Selenska-Pobell S., Matys S., Pompe W., Bottcher H.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **26**, 1209 (2003).
49. Amoura M., Brayner R., Perullini M., Sicard C., Roux C., Livage J., Coradin T.: *J. Mater. Chem.* **19**, 1241 (2009).
50. Bolyo J., Mair T., Kuncová G., Hauser M. J. B.: *Biophys. Chem.* **153**, 54 (2010).
51. Djambaski P., Aleksieva P., Emanuilova E., Chernev G., Spasova D., Nacheva L., Kabaivanova L., Salvado I. M. M., Samuneva B.: *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **23**, 1270 (2009).
52. Samuneva B., Djambaski P., Kashchieva E., Chernev G., Kabaivanova L., Emanuilova E., Salvado I. M. M., Fernandes M. H. V., Wu A. Y.: *J. Non-Cryst. Solids* **354**, 733 (2008).
53. Samuneva B., Kabaivanova L., Chernev G., Djambaski P., Kashchieva E., Emanuilova E., Salvado I. M. M., Fernandes M. H. V., Wu A.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **48**, 73 (2008).
54. Ciriminna R., Sciortino M., Alonzo G., de Schrijver A., Pagliaro M.: *Chem. Rev.*, v tisku. DOI: 10.1021/cr100161x.
55. Sigma-Aldrich webový katalog (www.sigmaaldrich.com), k.č. 38366: Lipase immobilized in Sol-Gel-AK, staženo 1.10.2010.
56. Dickson D. J., Page C. J., Ely R. L.: *Int. J. Hydrogen Energy* **34**, 204 (2009).
57. Schipunov Y., v knize: *Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials: Strategies, Syntheses, Characterization and Applications*, (Ruiz-Hitzky E., Ariga K, Lvov Y. M., ed.), kap. 3, 1. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2008.
58. Cappelletti E., Carturan G., Piovan A.: US 5,998,162 (1999).
59. Rooke J. C., Leonard A., Su B. L.: *J. Mater. Chem.* **18**, 1333 (2008).
60. Amoura M., Nassif N., Roux C., Livage J., Coradin T.: *Chem. Commun.* **2007**, 4015.
61. Kessler V. G., Seisenbaeva G. A., Unell M., Hakansson S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **47**, 8506 (2008).
62. Shan G. B., Xing J. M., Zhang H. Y., Liu H. Z.: *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4497 (2005).
63. Cha J. N., Shimizu K., Zhou Y., Christiansen S. C., Chmelka B. F., Stucky G. D., Morse D. E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 361 (1999).
64. Branyik T., Kuncova G., Paca J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 168 (2000).
65. Gavlasova P., Kuncova G., Kochankova L., Mackova M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **62**, 304 (2008).
66. Benmouhoub N., Simmonet N., Agoudjil N., Coradin T.: *Green Chem.* **10**, 957 (2008).
67. Nassif N., Coiffier A., Coradin T., Roux C., Livage J., Bouvet O.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **26**, 1141 (2003).
68. Fiedler D., Hager U., Franke H., Soltmann U., Bottcher H.: *J. Mater. Chem.* **17**, 261 (2007).
69. Bottcher H., Soltmann U., Mertig M., Pompe W.: *J. Mater. Chem.* **14**, 2176 (2004).
70. Soltmann U., Bottcher H., Koch D., Grathwohl G.: *Mater. Lett.* **57**, 2861 (2003).
71. Carnes E. C., Lopez D. M., Donegan N. P., Cheung A., Gresham H., Timmins G. S., Brinker C. J.: *Nat. Chem. Biol.* **6**, 41 (2010).
72. Nassif N., Bouvet O., Rager M. N., Roux C., Coradin T., Livage J.: *Nat. Mater.* **1**, 42 (2002).
73. Premkumar J. R., Lev O., Rosen R., Belkin S.: *Adv. Mater.* **13**, 1773 (2001).
74. Premkumar J. R., Sagi E., Rozen R., Belkin S., Modestov A. D., Lev O.: *Chem. Mater.* **14**, 2676 (2002).
75. Ferrer M. L., Garcia-Carvajal Z. Y., Yuste L., Rojo F., del Monte F.: *Chem. Mater.* **18**, 1458 (2006).
76. Pannier A., Oehm C., Fischer A. R., Werner P., Soltmann U., Bottcher H.: *Enzyme Microb. Technol.* **47**, 291 (2010).
77. Fennouh S., Guyon S., Livage J., Roux C.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **19**, 647 (2000).
78. Wang B., Liu P., Tang R. K.: *Bioessays* **32**, 698 (2010).
79. Inama L., Dire S., Carturan G., Cavazza A.: *J. Biotechnol.* **30**, 197 (1993).
80. Van Hoecke K., De Schampheleere K. A. C., Van der Meer P., Lucas S., Janssen C. R.: *Environ. Toxicol. Chem.* **27**, 1948 (2008).
81. Chen J. P., Lin Y. S.: *Process Biochem.* **42**, 934 (2007).
82. Matys S., Raff J., Soltmann U., Selenska-Pobell S., Bottcher H., Pompe W.: *Chem. Mater.* **16**, 5549 (2004).
83. Nassif N., Roux C., Coradin T., Bouvet O. M. M., Livage J.: *J. Mater. Chem.* **14**, 2264 (2004).
84. Close D. M., Ripp S., Sayler G. S.: *Sensors* **9**, 9147 (2009).
85. Adamová N.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2009.
86. Taylor A. P., Finnie K. S., Bartlett J. R., Holden P. J.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **32**, 223 (2004).

87. Fennouh S., Guyon S., Jourdat C., Livage J., Roux C.: *Compte-Rendu De Chimie* 2, 625 (1999).
88. Bressler E., Pines O., Goldberg I., Braun S.: *Biotechnol. Prog.* 18, 445 (2002).
89. Aguirre G., Arriola G., Lopez T., Gomez J., Picquart M., Aguilar D. H., Quintana P., Alvarado-Gil J. J., Pacheco J.: *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 33, 59 (2005).
90. Chen J. P., Lin Y. S.: *J. Chin. Inst. Chem. Eng.* 38, 235 (2007).
91. Muller W. E. G., Engel S., Wang X. H., Wolf S. E., Tremel W. G., Thakur N. L., Krasko A., Divekar M., Schroder H. C.: *Biomaterials* 29, 771 (2008).

G. Kuncová and J. Trögl (^a*Institute of Chemical Process Fundamentals, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* ^b*Department of Technical Sciences, Faculty of Environment, J. E. Purkyně University, Ústí nad Labem*): **Living Microorganisms Immobilized in Inorganic Matrices**

The hybrid biocatalysts comprising of living microbial cells encapsulated in inorganic or organic-inorganic matrices can be utilized in synthesis of pharmaceuticals, remediation technologies and biosensor construction. Silica, due to its biocompatibility, is a promising host for the purpose. The topic is reviewed starting from first experiments in 1981 to the current state of the art of encapsulation of living microorganisms in inorganic matrices, focusing on the physiology of encapsulated microorganisms. In the Czech Republic, the research in this field, on the borderline of materials science, inorganic chemistry and microbiology, has been performed since 1994.



S politováním oznamujeme, že v pondělí 17. října zemřel náš dlouholetý redaktor doc. PhMr. RNDr. Jiří Volke, DrSc. ve věku 85 let.

Pan doc. Volke v naší redakci pracoval dlouhých 52 let a v r. 2006 byl za svou práci odměněn Čestným členstvím České společnosti chemické.

Při našich pravidelných redakčních kruzích nám bude moc chybět.

redakce