

Detekce kontaminací v mikrořasových kulturách

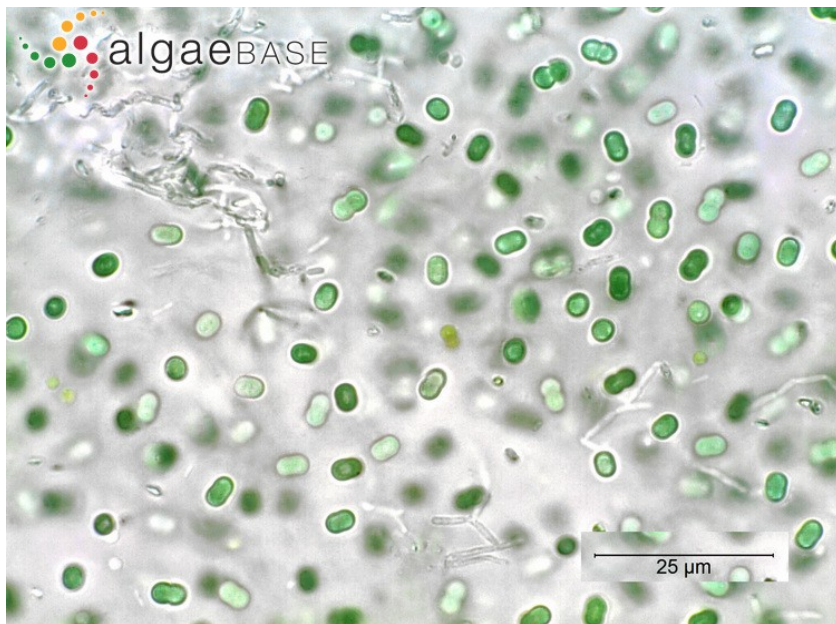
Cíl: vyvinout metodu, kterou budeme schopni rychle a spolehlivě detekovat kontaminanty v kulturách mikrořas

Implementace: Mgr. Lucie Grodecká, Ph.D. a vy

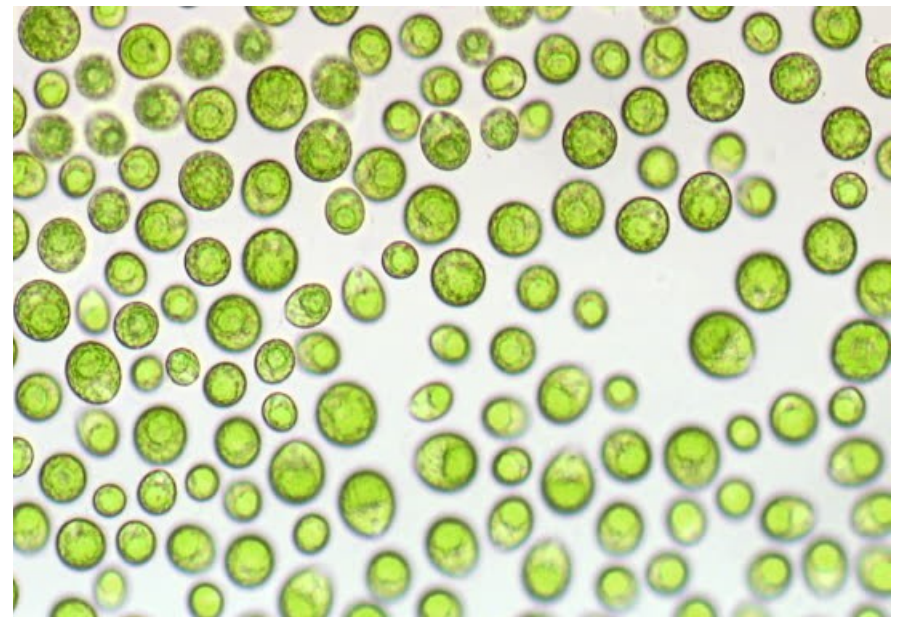


Mikrořasy

- Mikroskopické organizmy; fytoplankton
 - Prokaryota i eukaryota
 - ± fotosyntetizující, vodní
 - Odhad: 200 000 – 800 000 druhů, popsáno asi 50 000 druhů



Synechococcus



Chlamydomonas

Kultivace mikrořas

- Polysacharidy: agar, algináty, karagenan
- Pigmenty – karotenoidy



Převzato z: AlgaeForBiofuels



Převzato z: Global Seafood Alliance

Kultivace mikrořas

- Polysacharidy: agar, algináty, karagenan
- Pigmenty – karotenoidy – lososi, kuřata, ovocné šťávy, etc.
- Doplnky stravy a krmiva



Převzato z: AlgaeForBiofuels



Převzato z: Global Seafood Alliance

Kultivace mikrořas

- Polysacharidy: agar, algináty, karagenan
- Pigmenty – karotenoidy – lososi, kuřata, ovocné šťávy, etc.
- Doplnky stravy a krmiva – kvůli hojnosti proteinů a PUFA (omega-3)
- Farmaceutické produkty



Převzato z: AlgaeForBiofuels



Převzato z: Global Seafood Alliance

Kultivace mikrořas

- Polysacharidy: agar, algináty, karagenan
- Pigmenty – karotenoidy – lososi, kuřata, ovocné šťávy, etc.
- Doplnky stravy a krmiva – kvůli hojnosti proteinů a PUFA (omega-3)
- Farmaceutické produkty – antimikrobiální, antivirové, fungicidní, neuroprotektiva, terapeutické proteiny



Převzato z: AlgaeForBiofuels



Převzato z: Global Seafood Alliance

Kultivace mikrořas

- Polysacharidy: agar, algináty, karagenan
- Pigmenty – karotenoidy – lososi, kuřata, ovocné šťávy, etc.
- Doplnky stravy a krmiva – kvůli hojnosti proteinů a PUFA (omega-3)
- Farmaceutické produkty – antimikrobiální, antivirové, fungicidní, neuroprotektiva, terapeutické proteiny
- Ekohnojiva, úprava odpadních vod, biopaliva(?), etc.



Převzato z: AlgaeForBiofuels



Převzato z: Global Seafood Alliance

Detekce kontaminací mikrořasových kultur

- Problém rozšíření technologie: ekonomická náročnost

Detekce kontaminací mikrořasových kultur

- Problém rozšíření technologie: ekonomická náročnost ... sklízení
- Problém kontaminací: bakterie, viry, houby, rotifera, améby, ale i necílové mikrořasy

Detekce kontaminací mikrořasových kultur

- Problém rozšíření technologie: ekonomická náročnost ... sklizení
- Problém kontaminací: bakterie, viry, houby, rotifera, améby, ale i necílové mikrořasy
- mohou znehodnotit kulturu během několika dnů, riziko šíření a perzistence, ztráta produktu + náklady na dekontaminaci → důležitost **včasné detekce**

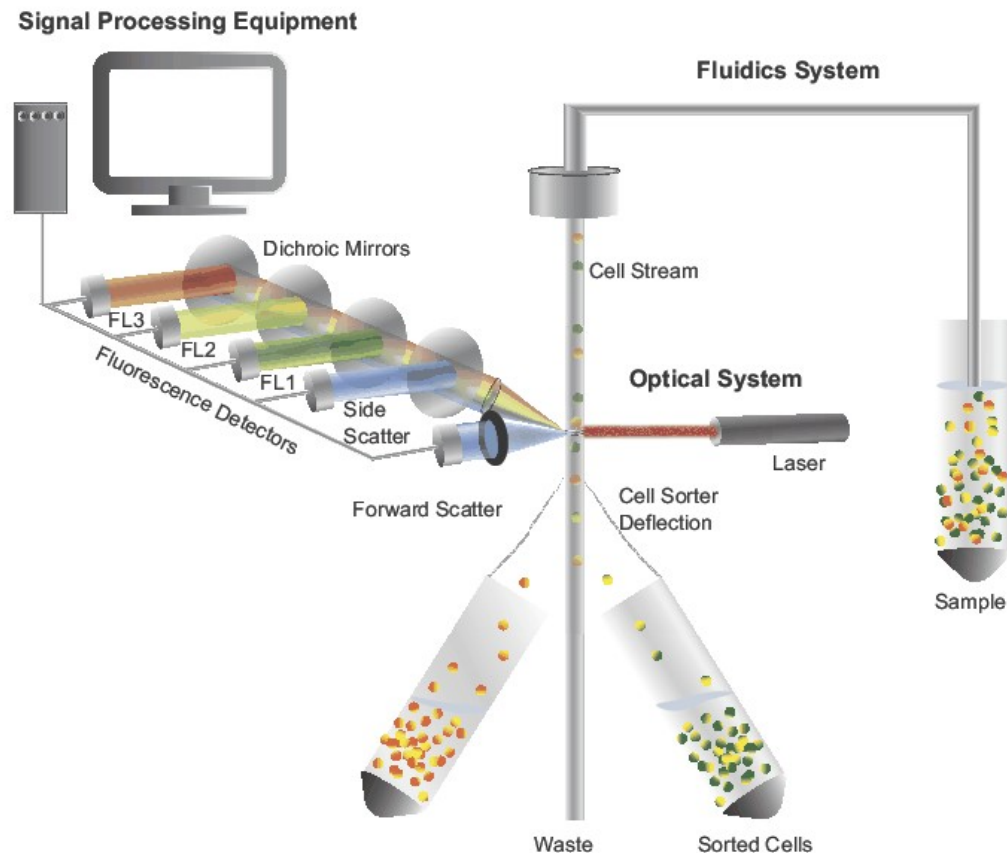
Možnosti detekce

- Mikroskopie: málo efektivní, pracná, náročná na expertýzu



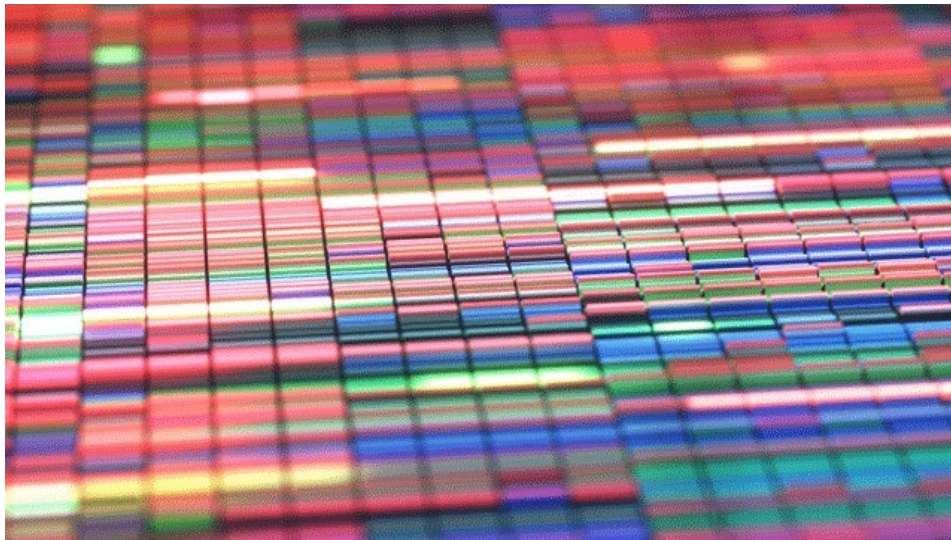
Možnosti detekce

- Mikroskopie: málo efektivní, pracná, náročná na expertýzu
- Průtoková cytometrie: efektivnější, citlivost nižší než u mol. metod



Možnosti detekce

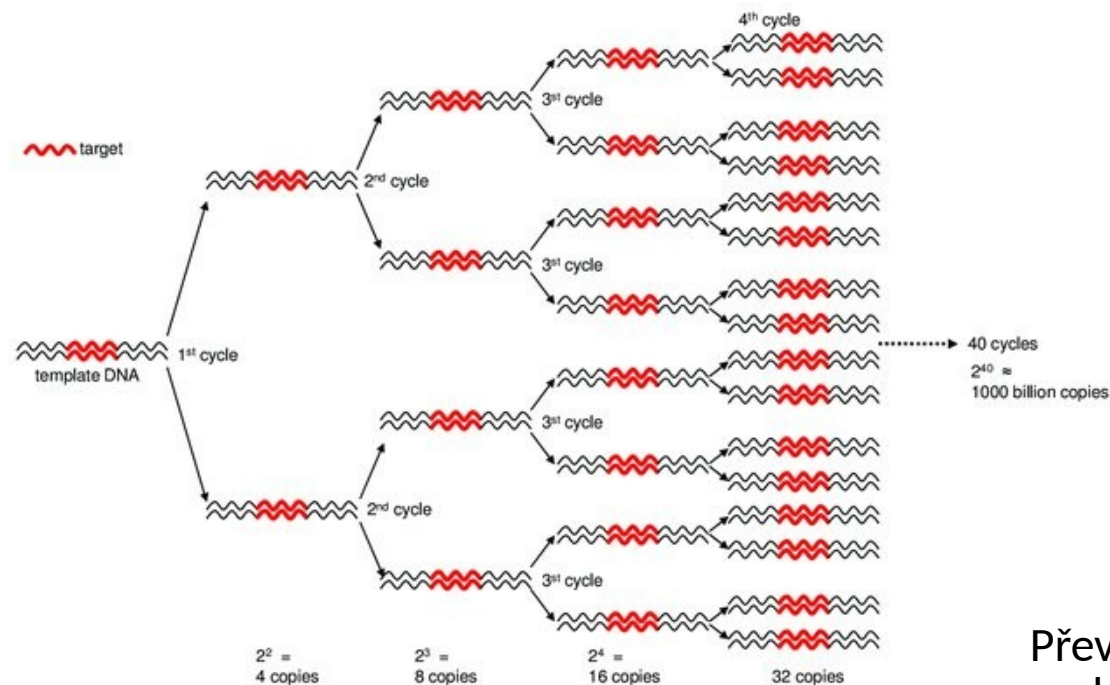
- Mikroskopie: málo efektivní, pracná, náročná na expertýzu
- Průtoková cytometrie: efektivnější, citlivost nižší než u mol. metod
- Sekvence: citlivá, lze zachytit i nečekané kontaminanty, zdlouhavá



Převzato z: www.technologynetworks.com

Možnosti detekce

- Mikroskopie: málo efektivní, pracná, náročná na expertýzu
- Průtoková cytometrie: efektivnější, citlivost nižší než u mol. metod
- Sekvenace: citlivá, lze zachytit i nečekané kontaminanty, zdlouhavá
- Metody založené na PCR: vysoce citlivé, rychlé, leč je třeba znát kontaminant, který chceme detekovat



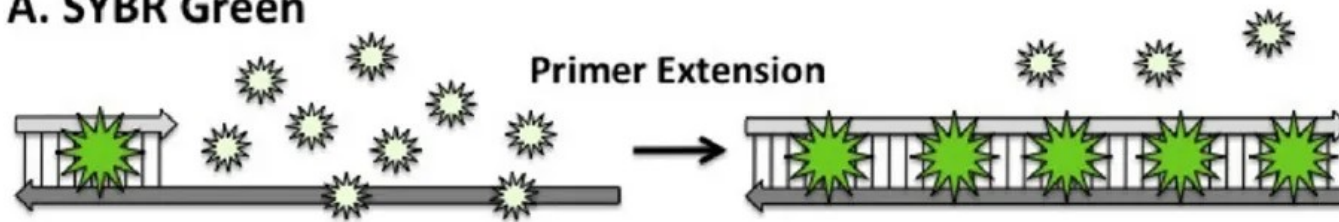
Převzato z: Rodriguez-Lazaro and Hernandez, 2013

Real-time PCR (qPCR)

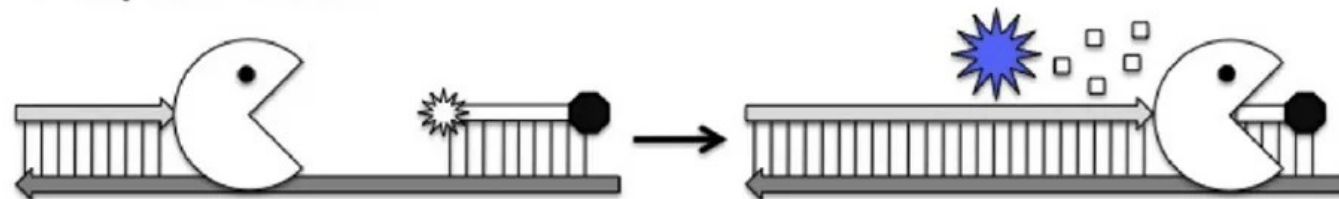
Fluorescenční detekce produktu během reakce

- Rychlá, vysoce citlivá i specifická

A. SYBR Green

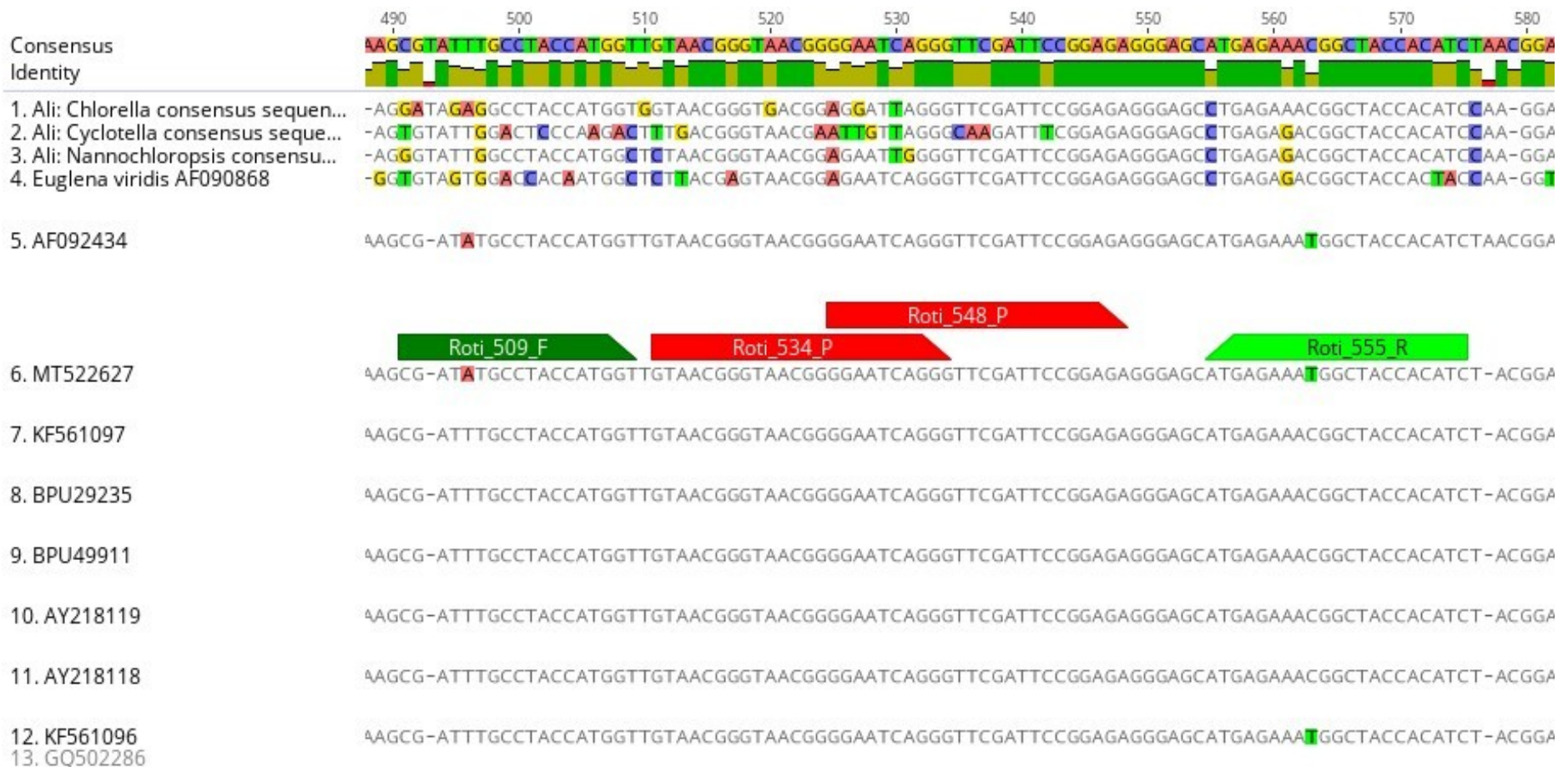


B. TaqMan Probe



Real-time PCR (qPCR)

Evolučně konzervované geny: možnost návrhu primerů specifických pro širší skupinu organismů, např. Rotifera



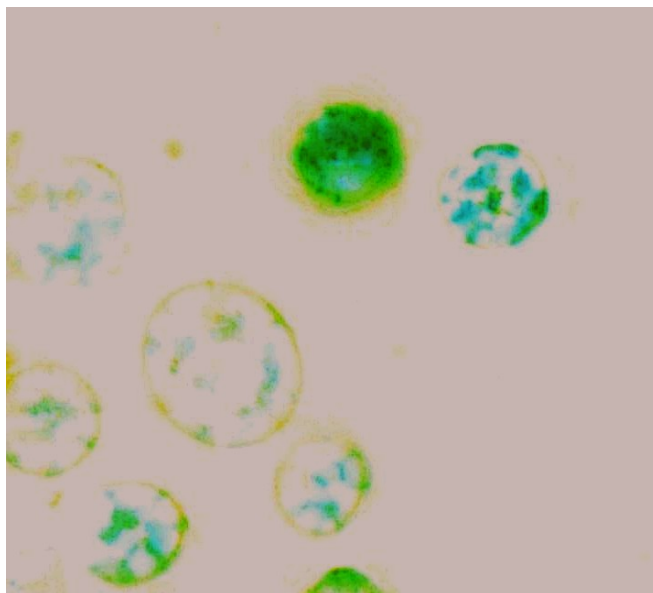
Nanopore sequencing: využití

- Identifikace mikrořasy kontaminujících organismů, které se běžně vyskytují v české kotlině
- Potřebujeme vzorky vody, které jsou bohaté na mikrořasy a tedy i na jejich predátory

Nanopore sequencing: pokyny

Každá skupina:

- dostane jednu 1,5 L vyčištěnou lahev (10% HCl)
- Odebere ve svém okolí vzorek eutrofické vody (1,5 L), lépe v rukavicích
- Vyfotí místo odběru a uloží souřadnice GPS
- Uchová vzorek pokud možno v chladu (cca 4° C) a nejpozději další den mi donese na Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno – Žabovřesky, heslo pro vrátného: „skleník“
- Termíny donášky: vždy po 3 skupinách v těchto dnech:
 - 29.9., 30.9., 1.10., vždy mezi 9. a 12. hodinou



Děkuji Vám za pozornost.