

EUKARYOTNÍ MIKROORGANISMY A NEPOLÁRNÍ POLUTANTY /KVASINKY V ROPĚ A TUCÍCH/

Jiří Mikeš, Martina Siglová, Miroslav Minařík
EPS, s.r.o. V Pastouškách 205, 686 04 – Kunovice
vyzkum@epssro.cz a www.epssro.cz

Abstrakt

Nepolární polutanty svými odlišnými vlastnostmi vyžadují, aby mikroorganismy, pro které se mají stát zdrojem uhlíku a energie, disponovaly specifickými buněčnými a metabolickými nástroji, jež jim umožní překlenout tyto překážky. Tento příspěvek se zabývá shrnutím dosavadních poznatků, jejich uspořádáním a nastíněním možných cest, jimiž se může výzkum, vývoj i reálné aplikace v blízké budoucnosti na poli environmentálních technologií ubírat. Potenciál eukaryotních mikroorganismů je v tomto ohledu poměrně nedocenený a ukrývá v sobě významný biologický nástroj, jehož aplikace může přispět k efektivní a ekonomicky výhodné nápravě škod způsobených antropogenní činností na životním prostředí.

Kvasinky a kvasinkové mikroorganismy disponují odlišnou kompozicí buněčných struktur a složitějším uspořádáním regulace jejich metabolické činnosti, včetně produkce vhodných extracelulárních enzymů, je předurčuje do role vhodných činitelů, jejichž prostřednictvím je možné aktivně přistupovat k nepolárním kontaminantům a zajistit jejich transformaci a zapojení do koloběhů hmoty v přírodě mnohem snáze, než pouhou depozicí v prostředí skládek. V příspěvku je shrnut dosavadní stav poznání, dále jsou nastíněny výzkumné záměry a aplikace jejich výsledků do podoby technologických procesů.

Úvod

Skutečnost, že mikroorganismy dokážou využívat nepolární látky (látky s vodou omezeně mísitelné) jako svůj zdroj uhlíku a energie je známá přibližně od 30. let dvacátého století. V nepřímých souvislostech se měl člověk možnost s tímto fenoménem setkat již na počátku svých dějin v podobě žluknutí másla a olejů nebo bez důslednější znalosti využil těchto skutečností v procesech přípravy některých potravin (sýrařství). Základním problémem biologické využitelnosti je bezesporu existence fázového rozhraní. V důsledku tohoto jevu je mikroorganismus nucen (má-li využívat polutant jako svůj zdroj uhlíku a energie) prostřednictvím svých enzymových nástrojů a složek buněčného povrchu překlenout tuto bariéru. Jedná se o určitou formu kolonizace mezifázového rozhraní, při které se uplatňuje vyšší hydrofobita buněčného povrchu taxonů schopných nepolární látky využívat a zároveň spektrum extracelulárně produkovaných enzymů, jejichž činností dochází k fragmentaci výchozího polutantu (zdroje) na menší molekuly.

Nepolární látky jako mikrobiální substráty

Posláním příspěvku je poskytnout ucelenější pohled na roli eukaryotních mikroorganismů (zejména kvasinek) v procesu transformace nepolárních látek (zejména lipidů a ropných uhlovodíků) v přirozeném prostředí jejich výskytu. Na základě shrnutí těchto faktů se pak dále zamýšlet nad jejich metabolickým potenciálem v kontextu jeho využití v sanačních technologiích založených na aplikaci biologického činitele. Schopnost zapojit svůj enzymový aparát do transformace výše zmíněných látek jako svých vhodných substrátů (zdrojů uhlíku a energie) je vlastní celé řadě mikrobiálních taxonů. V mikrobiologii je pro ně obecně vžitě označení lipolytické mikroorganismy (Fickers, 2005). S ohledem na specifické vlastnosti nepolárních látek odvíjející se od jejich chování ve vodném prostředí (tvorba fázových rozhraní) existuje řada omezujících faktorů, které vyžadují, aby mikroorganismus disponoval takovými prostředky, jež mu umožní tyto limity překonat. Jedná se v první řadě o vhodně složené obalové struktury, jež mu umožní dostat se do blízkosti fázového

rozhraní, dále nástroje, jejichž prostřednictvím bude molekula látky vykazující konkrétní vyšší stupeň nesmáčitosti aktivována a následně pomocí uzpůsobených transportních mechanismů bude zajištěn přestup z vnějšího prostředí do prostředí vnitrobuněčného. Zde se v závěrečné fázi uplatní zejména metabolické dráhy souhrnně označované jako beta oxidace (Pagot, 1997). Jsou-li splněny popsání předpoklady, otevírá se danému mikroorganismu řada možností, jak metabolicky a energeticky profitovat ze zdrojů, které díky svým specifickým vlastnostem jsou pro taxony nevybavené v dostatečné míře tímto enzymovým spektrem nedostupné.

Mikroorganismy

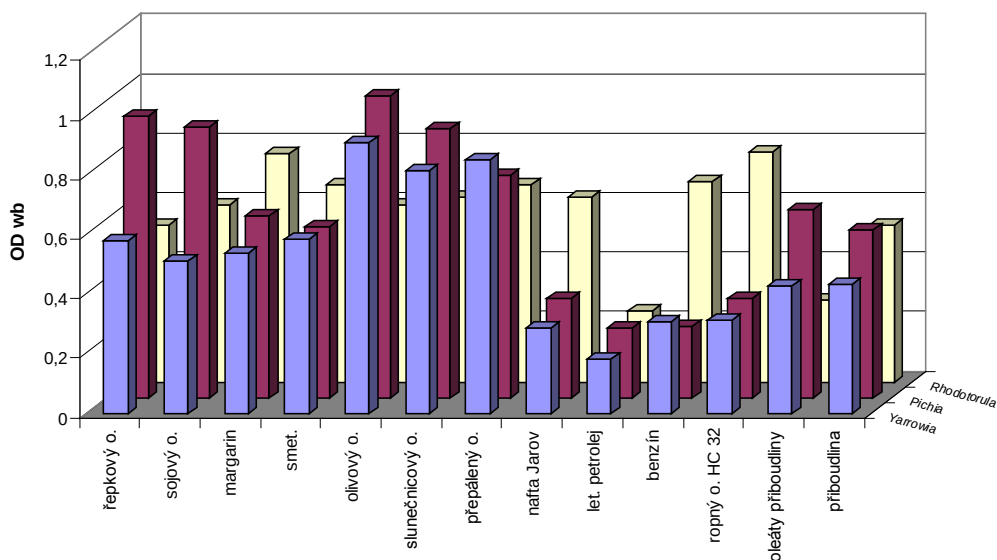
Jako podtitul přednášky byl zvolen název „kvasinky v ropě“. Ve specializovaných podoborech mikrobiologie, mezi něž náleží *petroleum microbiology*, mikrobiologie zabývající se studiem fyziologických a taxonomických aspektů mikroflóry přítomné v ložiscích petrochemických surovin, resp. v zařízeních tohoto typu průmyslu, zaujme pozornost konstatování, že díky své lepší vybavenosti buněčné struktury a enzymového aparátu jsou právě kvasinkové mikroorganismy dominujícím mikrobiálním typem v ropě a produktech vzniklých její rafinérskou úpravou. Ollivier a Magot (2005) doslova uvádějí příklady experimentálních výstupů, na jejichž základě bylo zjištěno, že zástupci kvasinkových rodů (*Candida*, *Yarrowia*, *Debaromyces*) doslova přerůstají v půdě kontaminované ropnými uhlovodíky své bakteriální konkurenty. Na konkrétním příkladě demonstrují výsledky studia mikrobiálního profilu konkrétního vzorku, kde z celkové sumy mikrobiálních kmenů připadalo na kvasinky 80% a na bakteriální zástupce pouhých 7%. Uvedené hodnoty lze celkem úspěšně obhájit, srovná-li se struktura povrchu těchto buněk, organizace obalových struktur a enzymové vybavení obou uvedených skupin. Výše uvedené tedy vnáší zcela nový náhled na bioremediační technologie ropných látek, jejichž problematika se v současnosti považuje za poměrně dobře rozvinutou, nicméně používané biopreparáty jsou koncipovány na bakteriální bázi (Ekundawo, 2000). Používání kvasinkových taxonů by mohlo výrazně zefektivnit tento typ bioremediací.

Spektrum aplikačního využití

Kontaminace prostředí však není zapříčiněna pouze ropnými polutanty. Neméně aktuálním problémem se ukazuje zbytečná depozice biologicky rozložitelných odpadů. Jednou z jejich hlavních složek jsou také lipidy, které se svým fyzikálně-chemickým chováním podobají ropným látkám. Právě lipolytické kvasinky by tak v blízké budoucnosti mohly sehrávat klíčovou úlohu v alternativním přístupu v odpadovém managementu (Oswal, 2002). Promyšleně koncipovaným technologickým sledem by v blízké budoucnosti mohlo být řešeno efektivnější využívání tohoto typu odpadů a takto ošetřené nepolární odpadní produkty biologického charakteru by následně mohly nalézt uplatnění v procesech produkce alternativních prostředků produkce energií, popř. být využity v zemědělské činnosti.

V laboratoři výzkumu a vývoje společnosti EPS, s.r.o. byly studovány 3 kvasinkové taxony (rody *Yarrowia*, *Pichia* a *Rhodotorula*) z hlediska jejich uplatnění v procesech biologického rozkladu nepolárních látek. Použitý soubor s vodou omezeně mísitelných substrátů zahrnoval poměrně rozsáhlou kolekci počínaje vzorky ropy a jejích petrochemických produktů, vzorky nepolárních složek odpadních produktů destilace lihu (přiboudliny), rostlinné a živočišné oleje a konče jejich odpadní formou vzniklou aplikací při přípravě pokrmů. Kvantifikace schopnosti vybraných taxonů byla řešena jak vsádkovou kultivací v Erlenmeyerových baňkách, tak pomocí automatizovaného kultivačního systému Bioscreen C. Na obrázku 1 jsou znázorněny souhrnné výsledky těchto experimentů.

biotechnologie



Obr. 1 Srovnání růstu testovaných taxonů kvasinek na různých typech substrátu jako rozdíl mezi maximálně dosaženou a počáteční hodnotou OD_{600} .

Vyhodnocením získaných datových souborů se ukázalo, že nejenom napříč studovanými kvasinkovými taxony, ale i v rámci spektra substrátů existují značně individuální preference. Tento poznatek nasměroval další výzkumnou práci do oblasti hledání koncentračních limitů substrátů a ke snaze najít vhodné kombinace mikrobiálních činitelů za účelem zefektivnění využitelnosti jejich metabolického potenciálu.

Výhledy

Podmínkou naplnění vizí, s nimiž seznamuje tento příspěvek, je důkladná znalost fyziologických stavů této mikroflóry, vymezení optimálních podmínek jejich růstu a reprodukce a zároveň nalezení limitů, které tuto činnost omezují. V delším časovém horizontu se předpokládá, že získané výsledky budou využity ke vzniku konkrétní sanační technologie založené na potenciálu eukaryotních taxonů (kvasinek, kvasinkových mikroorganismů). Tato technologie je zamýšlena jako inovativní rozšíření souboru standardně používaných postupů v rámci ČR. Objektem zájmu aplikace tohoto technologického přístupu budou v první řadě látky ze skupiny ropných uhlovodíků, popřípadě také další nepolární substráty (např. odpadní lipidy).

Literatura

- Ekundayo (2000), Obuekwe: Hydrocarbon utilization in yeast isolates found to grow in association with petroleum in a polluted Ultisol in midwest Nigeria
 Fickers (2005): Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential application
 Levinson (2007): New microbial system for utilization of glycerol and plant lipids
 Miller, Johnson (2004): Utilization of gas oil by a yeast culture
 Olivier, Magot (2000), in **Petroleum Microbiology**
 Oswal (2002): Palm oil mill effluent treatment by a tropical marine yeast
 Pagot (1997): Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve gamma-decalactone production yields