

ŽIVOT V ROPĚ – BIOREMEDIAČNÍ POTENCIÁL
LIFE IN THE CRUDE OIL – THE POTENTIAL OF BIOREMEDIATION
Jiří Mikeš¹⁾, Martina Siglová¹⁾, Miroslav Minařík¹⁾, Marek Šír²⁾, Zuzana Honzajková²⁾

1) EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice

2) Ústav chemie ochrany prostředí, FTOP, VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha 6
eps@epsro.cz, www.epsro.cz

1 Abstrakt

Příspěvek shrnuje dosavadní výstupy výzkumného projektu spojeného s biosurfaktanty produkovanými lipofilními kvasinkami. Ukazuje se, že se jedná o technologicky nesmírně zajímavý podpůrný prostředek pro bioremediační aplikace vzhledem k nulové toxicitě. Během řešení projektu se podařilo shromáždit velmi pozoruhodný soubor poznatků o životě eukaryotních mikroorganismů v prostředích s nepolárními fázemi, z nichž lze v mnoha ohledech velmi dobře profitovat v aplikacích technické ochrany životního prostředí. Potenciální uplatnění je však mnohem širší, než pouze v rámci sanačního inženýrství, ale třeba v tzv. terciární dotěžbě ložisek ropy (EOR). V neposlední řadě hlubší poznání interakce mikroorganismus versus nepolární prostředí může být přínosné i jako prevence vůči negativnímu mikrobiálnímu působení (tzv. biodeteriorace – znehodnocení pohonných hmot a biokoroze jejich zásobníků).

Abstract

This contribution summarizes the outcomes of the research project associated with biosurfactants produced by lipophilic yeasts. It turns out that this is a very interesting technology as a support tool for bioremediation applications due to their low toxicity. During the project solution, a remarkable body of knowledge was collected and it describes the life of eukaryotic microorganisms in environments with non-polar phase. In many respects, a very good profit in the technical applications of environmental protection may be used. The potential application is much wider than just in the clean-up engineering, remediation, but for example in the enhanced oil recovery (EOR). Finally, a deeper understanding of the interaction between microorganisms and non-polar environment can be beneficial as prevention against adverse microbial activity (i.e. biodeterioration – fuel depreciation and biocorrosion of the reservoirs).

Klíčová slova:

biosurfaktanty, lipofilní mikroorganismy, biodegradace nepolárních látek

Key words:

biosurfactants, lipophilic microorganisms, biodegradation of non-polar compounds

2 Úvod

Mikroorganismy jsou schopné osídlit a trvale obývat neskutečně široké spektrum typů prostředí. I tak zdánlivě nefyziologické systémy, jakými může být ropná fáze, oplývají mikrobiálním životem. Z hlediska mechanismů a podmínek, kterými příslušný mikroorganismus musí disponovat a které by měly být splněny, je na předních místech potřeba zmínit přítomnost vody, zdroje uhlíku a energie a z fyzikálně-chemického hlediska otevřenost celého systému, tzn. možnost vstupu a výstupu látek do buňky a z buňky ven. Právě překonání bariéry fázového rozhraní je v mikrobiální rovině vyřešeno dvěma velmi pozoruhodnými způsoby: (1) hydrofobním, vodu odpuzujícím povrchem buňky

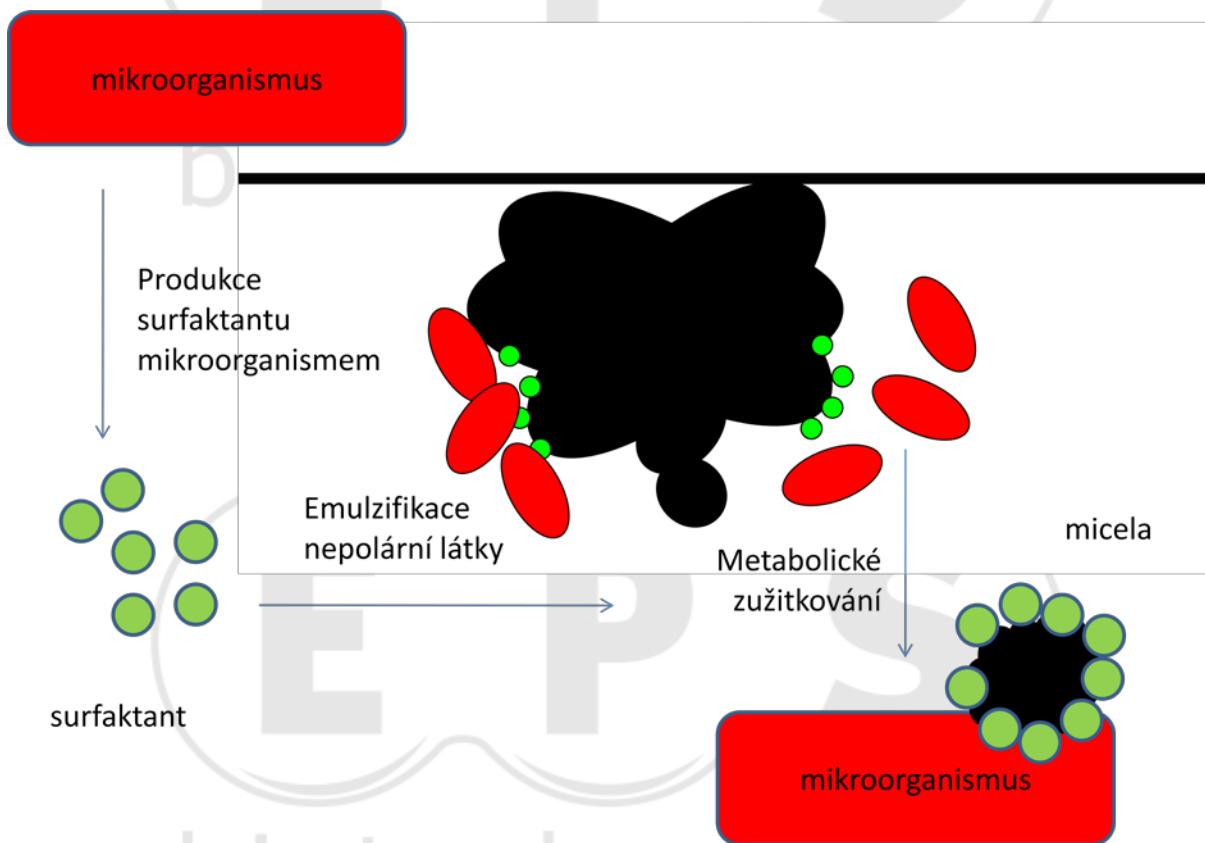
a (2) produkcí povrchově aktivních látek biologického původu [Mulligan]. Existuje celá řada dalších podpůrných procesů jako specifická enzymová výbava pro degradaci dlouhých řetězců nepolárních látek, nicméně v této části příspěvku je pozornost zaměřována hlavně na výše uvedené.

Proč hydrofobní povrch?

Již v dobách, kdy chemii nahrazovala alchymie, bylo známo, že *similia similibus solvuntur*, neboli podobné se rozpouští v chemicky podobném. V případě mikroorganismů nejde o rozpouštění, nicméně hydrofobní charakter povrchu buňky výrazně napomáhá v překonání povrchových napětí na fázových rozhraních a otevírá takto disponovaným mikroorganismům přístup do nepolárního prostředí.

Proč povrchově aktivní látky?

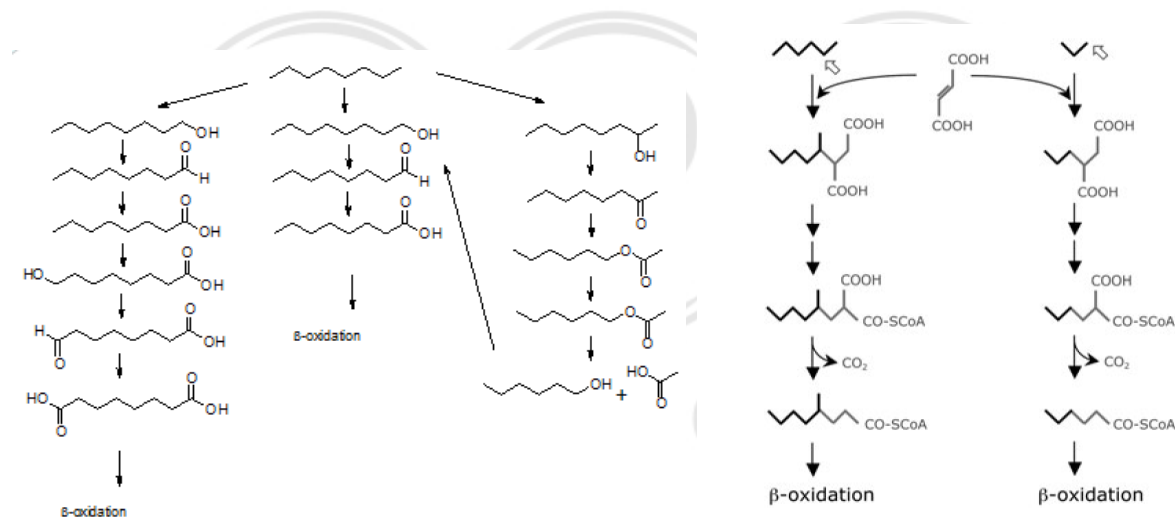
Detergentem, surfaktantem nebo jinak povrchově aktivní látkou je každá molekula, která má amfifilní (amfipatický) charakter, což znamená, že je tvořena jak částí polární, tak částí nepolární, a díky tomu dokáže snížit povrchové napětí na fázových rozhraních. Existuje mnoho druhů synteticky vyráběných surfaktantů pro bezpočet aplikací počínaje využitím při jakémkoliv čištění, konče environmentálními aplikacemi na bázi sanačního promývání. Člověkem vyráběné povrchově aktivní látky mívají v mnoha případech zcela konkrétní nečinnost, již je obtížná odbouratelnost v prostředí a mnohdy i toxicita vůči organismům. Ta je způsobena perzistencí těchto molekul a dlouhodobou negativní expozicí vůči cytoplasmatické membráně, kterou učiní zcela propustnou, tedy převede ji do stavu neslučitelného s životem buňky. Biosurfaktanty (jak ukazují různé studie) nejenom, že nevykazují téměř žádnou toxicitu, jsou poměrně snadno odbouratelné přirozenými procesy v prostředí, ale (co je nejdůležitější), svými technickými vlastnostmi jsou srovnatelné s řadou synteticky vyráběných [Kosaric]. Z pohledu biologického činitele mu plní stejnou funkci jako v případě čištění povrchu materiálu (jeho odmašťování), použití mýdla nebo praní textilu, tedy snížení povrchového napětí a překonání tohoto typu bariéry za účelem destrukce nepolární fáze a její převedení do rozpustné podoby reprezentované tzv. micelami. Micela vzniká po dosažení kritické micelární koncentrace, kdy určitý počet povrchově aktivních molekul se seskupí do organizovaného útvaru s nepolárním jádrem, do kterého může být zahrnuta částice hydrofobní látky (tedy i polutantu). Na obrázku 1 je znázorněno chování lipofilních mikroorganismů, biosurfaktantu a nepolární látky ve vodném prostředí.



Obr. 1 Zjednodušený klíčový sled procesů spojených s životem v přítomnosti nepolární látky.

2.1 Lipofilní mikroorganismy

Při hlubším proniknutí do problematiky zase není obsah předešlých odstavců tolik překvapivý. Lipidy obecně, konkrétně živočišné nebo rostlinné tuky, jsou vítaným substrátem pro řadu mikroorganismů, které ho rozkládají za účelem získání zdroje uhlíku a energie. V potravinářství se tyto aktivity projevují jako biologické znehodnocení některých typů potravin. Vedle bakterií, které disponují schopností využívat nepolární substráty, popř. v nich existovat, se lze setkat i s eukaryotními mikroorganismy – s plísněmi a zejména s kvasinkami. Metabolismus těchto mikroorganismů se v aerobním režimu opírá o tzv. beta oxidaci, což je proces postupné degradace uhlovodíkového řetězce založený na enzymovém ataku konce molekuly oxidačním způsobem. Z energetického hlediska se jedná o velmi výhodný způsob získávání energie i stavebních komponent. V anaerobním prostředí je mechanismus odlišný a ne tolik energeticky výhodný, nicméně nelze zpochybnit, že by za anaerobních podmínek degradace nepolárních substrátů neprobíhala, naopak. Velmi zjednodušeně se jedná o enzymově podpořenou inkorporaci fumarové kyseliny do uhlovodíkového řetězce a následné zapojení do modifikovaných forem beta oxidace v buněčném prostředí [Townsend]. Přítomnost fázového rozhraní mezi polárním a nepolárním systémem je limitem pro takovou distribuci kyslíku, o níž by bylo možné tvrdit, že se jedná o aerobní prostředí, spíše tomuto uspořádání náleží označení anoxický systém. Principiálně jsou oba hlavní metabolické režimy znázorněny na obrázku 2. V následujících dvou odstavcích jsou uvedeny formou seznamu bakteriální a houbové rody, které v uplynulé době byly evidovány jako schopné života v prostředí obsahujících nepolární látky.



Obr. 2 Aerobní (vlevo) a anaerobní mikrobiální metabolismus nepolárních látek. V anaerobním režimu je klíčová role fumarové kyseliny. (upraveno podle www.metamicrobe.com)

lipofilní bakterie

Actinobacteria, Arthrobacter, Brevibacterium, Brachybacterium, Dietzia, Cellulomonas, Janibacter, Mycobacterium, Corynebacterium, Gordonia, Nocardia, Flavobacteria, Chryseobacterium, Yeosuana, Thermus, Petrotoga, Bacillus, Geobacillus, Staphylococcus, Sphingomonas, Sphingobium, Paracoccus, Stappia, Roseobacter, Thalassospira, Tistrella, Ochrobactrum, Achromobacter, Acidovorax, Burkholderia, Azoarcus, Desulfobacterium, Pseudomonas, Marinobacter, Pseudoalteromonas, Pasteurella, Shewanella, Acinetobacter, Halomonas, Alcanivorax, Thalassolituus, Oleispira, Neptunomonas, Oleiphilus, Rhodanobacter, Xanthomonas

lipofilní kvasinky, kvasinkovité mikroorganismy a plísně

Ascomycota, Helminthosporium, Aureobasidium, Candida, Hansenula, Debaryomyces, Yarrowia, Lipomyces, Geotrichum, Trichoderma, Fusarium, Dendryphiella, Cladosporium, Corollospora, Lulworthia, Aspergillus, Rhodotorula, Trichosporon, Phanerochaete, Pleurotus, Mortierella, Cunninghamella, Mucor

2.2 Rozklad ropných látek biologickou cestou a technologická řešení

Je zřejmé, že obdobně jako v případě jiných bioremediací existuje rozklad aerobní a rozklad probíhající za podmínek anoxických. Oba dva mechanismy se uplatňují jak v procesech přirozené atenuace, tak v inženýrských aplikacích – in situ zákrocích koncipovaných přímo na lokalitách zatížených ropným znečištěním, tak *ex situ* technologiemi, kdy je kontaminovaná matrice životního prostředí zpracovávána mimo postiženou lokalitu.

2.2.1 Aerobní biodegradace

Tento režim transformace ropných látek vykazuje nejvíce analogických znaků s metabolismem tuků a lipidů. Principem je sekvenční oxidace redukované formy (ropné uhlovodíky) prostřednictvím specifických oxidas (enzymů katalyzujících konkrétní oxidační krok) přes alkohol, aldehyd a kyselinu, která se následně v rámci hlavního metabolismu zapojuje do tzv. Krebsova cyklu (stěžejní buněčný cyklus katabolického metabolismu). Tento popsáný proces používá zařité označení beta oxidace z důvodu, že tím atomem uhlíku, jenž je transformován, je druhý v pořadí od funkční skupiny. Tato terminologie je odvozena z oxidace mastných kyselin, které jsou vedle glycerolu klíčovou komponentou tuků a vykazují díky svým dlouhým uhlovodíkovým řetězcům největší paralelu s řetězci ropných uhlovodíků.

2.2.2 Anaerobní oxidace

Z energetické bilance vyplývá, že anaerobní metabolismus je v porovnání s metabolismem aerobním méně výhodným způsobem, organismus získá v absolutním vyjádření méně energie než ve srovnatelně probíhajícím aerobním procesu. Výhodu mají tzv. fakultativní mikroorganismy, které disponují oběma typy metabolismu a v momentě vyčerpání kyslíku jako zdroje elektronového akceptoru jsou schopné přepnout svou látkovou výměnu do režimu anoxického (např. kvasinky). Anaerobní mikroorganismy jsou odkázané výhradně na zisky vyplývající z jim ontogeneticky daného mechanismu, který mají ve svém portfoliu metabolických nástrojů. Anaerobní rozklad je principiálně podobný aerobnímu s tím rozdílem, že jako akceptor elektronu figurují látky typu dusičnany, železité a manganické ionty a sírany. V případě uhlovodíků ropného původu je možný i anaerobní radikálový mechanismus; v tomto případě musí mikroorganismus disponovat vhodnými nástroji, jež ho ochraňují před výrazně toxičtějšími radikálovými meziprodukty.

3 Experimentální rámec

Společnost EPS, s.r.o. izolovala v roce 2005 kvasinkový taxon *Yarrowia lipolytica* z fáze ropné kontaminace v laguně dehtů v Litvínově [Mikeš]. Potvrdily se poznatky získané studiem přirozeného osídlení trvale exponovaných lokalit ropou (ropná pole), kdy bylo zjištěno, že výrazně převládajícím typem mikrobiálního osídlení jsou právě kvasinkové mikroorganismy. Proč dominuje konstrukčně složitější a z hlediska regulace výrazně náročnější fyziologie a metabolismus eukaryotních mikroorganismů? Ukazuje se, že odpovědí na tyto otázky je právě propracovanější schopnost řízení produkce klíčové látky, která umožňuje překlenutí fázového rozhraní a zajišťuje mechanismy umožňující žít v takovýchto podmínkách – tedy unikátní biologické molekuly látek s povrchovou aktivitou [Ollivier]. Recentní studie je klasifikují jako skupinu tzv. soforolipidů [Daverey], tedy surfaktantů s přítomností látek na bázi lipidů v jejich molekule. V rámci řešení výzkumného projektu, jehož cílem je zdokonalit produkci a technické uchopení výše načrtnutých principů do podoby technologie eliminace kontaminací způsobených uhlovodíky ropného původu, byly v prvním roce řešení provedeny experimenty za účelem postihnout schopnost života těchto mikroorganismů v prostředí ropné fáze. V systému 1:1 (objemově) minerální médium BSM a ropa z dřívějších Moravských naftových dolů se sledovala míra schopnosti osídlit toto prostředí a kvantifikovat ho. K vyšetření těchto schopností se použily konvenční metody stanovení počtu

mikroorganismů na agarovém médiu připraveném ze ztuženého minerálního média s přidavkem 0,1 g/l *yeast nitrogen base* (YNB), což představuje kvasinkami vyžadovaný a snadno využitelný zdroj dusíku pro překlenutí případných adaptačních problémů spojených se změnou kultivačního režimu a systému (baňka – ztužená agarová půda). Experiment trval 7 dní za laboratorních podmínek a po zastavení třepání na rotační třepačce (120 rpm) a ustavení fázové rovnováhy byl analyzován podíl mikroorganismů ve vodné a v nepolární fázi. Na obrázku 3 je znázorněno číselně zastoupení populací studovaných kvasinkových taxonů ve výše pospaném systému.

taxon	osídlení fáze v cfu/ml	podíl v nepolární fázi v %	podíl ve vodné fázi v %
<i>Geotrichum candidum</i>	$1,4 \cdot 10^5$	44 %	56 %
<i>Debaryomyces hansenii</i>	$1,1 \cdot 10^5$	52 %	48 %
<i>Lipomyces starkei</i>	$3,5 \cdot 10^5$	51 %	49 %
<i>Yarrowia lipolytica</i>	$4,3 \cdot 10^5$	64 %	36 %
<i>Candida utilis</i>	$1,8 \cdot 10^5$	54 %	46 %
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	$7,5 \cdot 10^4$	27 %	63 %

Obr. 3 Distribuce studovaných kvasinek mezi vodným a nepolárním prostředím.

Z výsledků, které představují průměr 3 nezávisle provedených experimentů, lze velmi dobře usuzovat na schopnosti studovaných kvasinkových mikroorganismů produkovat dostatečná množství různých typů biologicky aktivních látek (surfaktantů), díky nimž je pro ně možné jako jediný zdroj uhlíku a energie využívat ropnou látku. Třepání systému zajistilo aerobní režim metabolismu a výrazně lepší distribuci hmotových toků v modelovém uspořádání (substrát, voda, mikroorganismus). Je tedy otázkou, do jaké míry se změny projeví, přiblíží-li se uspořádání reálným podmínkám. Nicméně s ohledem na možnost metabolických alternací v podobě fermentujícího charakteru metabolismu, by omezení v dodávce kyslíku neměla být fatální. Experimentálně výzkum spěje do roviny zaměření pozornosti na kvantifikaci a charakterizaci konkrétních surfaktantů pro bioremediační účely.

3 Závěr

Jakékoliv poznání v oblasti mikrobiálního života v nepolární fázi je nesmírně cenné jak z hlediska technické ochrany životního prostředí, tak i v průmyslových aplikacích (terciární dotěžba ropných látek – zde je otázkou případná míra znehodnocení ropy jako suroviny s přidavkem mikrobiální produkce povrchově aktivní látky) a taky prevence v hledání vhodných inhibitorů, jak mikroorganismům zabránit v ropě a jejich produktech žít a tím eliminovat biologickou korozi produktodů a rezervoárů a znehodnocení pohonných hmot.

4 Reference

Daverey A., Pakshirajan K. and Sangeetha P.: Sophorolipids production by *Candida bombicola* using synthetic dairy wastewater. Int. J. Civ. Env. Eng. 2009:4

Kosaric N.: Biosurfactants in industry. Pure & Appl. Chem., Vol. 64, No. 11, pp. 1731-1737,1992,

Mikeš J., Siglová M. a Minařík M.: Eukaryotní mikroorganismy a nepolární substráty / Kvasinky v ropě a tucích, Sanační technologie XI. 2008 Ekomonitor

Mulligan C.N.: Environmental applications for biosurfactants. Environ Pollut. 2005, Jan;133(2) 183-98

Ollivier B., Magot M.: Petroleum Microbiology, 2005,ASM Press

Townsend GT., Prince RP, and Suflita J.M.: Anaerobic oxidation of crude oil hydrocarbons by the resident microorganisms of a contaminated anoxic aquifer. Environ. Sci. Technol. 2003, 37 (22), 5213–5218

Poděkování

Tento projekt je podporován Technologickou agenturou České republiky v rámci jejího programu Alfa s číslem TA 01020482 a názvem Vývoj biologického surfaktantu pro sanační promývání kontaminovaných matric životního prostředí.

Dále autoři děkují Ing. Daně Savické z Ústavu biochemie a mikrobiologie FPBT VŠCHT Praha za poskytnutí 5 studovaných taxonů pro komparativní účely.