

Biosurfaktanty

MODERNÍ STIMULAČNÍ ČINIDLA PŘIROZENÝCH BIODEGRADAČNÍCH PROCESŮ

Horninové prostředí znečištěné látkami omezeně mísitelnými s vodou (ropné uhlovodíky, chlorované uhlovodíky, ftaláty, PAU a další) představuje specifický systém jak z hlediska biologických činitelů, tak technologických opatření i rizik, která z něho vyplývají vůči lidskému zdraví i ekosystému.

Při návrhu sanačních opatření je vhodné uplatnit více metod (nejlépe kombinaci fyzikálně-chemických s biologickými), aby byl dekontaminační efekt trvalý. Od určitých koncentrací kontaminantu, jehož původní množství bylo nejčastěji sníženo aplikací metod na bázi pump and treat nebo přirozenou mobilitou složek kontaminanta, popř. jejich kombinací, vznikají podmínky uplatnění přirozených mikrobiálních společenstev vybavených biodegradačními mechanismy.

Biostimulace

Samotná přirozená atenuace by však jako řešení daného problému v drtivé většině případů trvala dlouho. Z těchto důvodů se často technické řešení opírá o proces biostimulace, což znamená aktivní ovlivnění nejenom chemismu prostředí ve prospěch biodegradační mikroflóry. Biostimulace bývá nejčastěji vnímána jako aplikace technických preparátů hnojiv, jimiž je podpořena dodávka zdrojů dusíku a fosforu původním mikroorganismům adaptovaným na podmínky přítomného selektivního tlaku kontaminantu.

Biostimulace však může mít i jinou podobu. Jejím uplatněním lze upravovat přirozené podmínky tak, aby byl kontaminant biologicky dosažitelný (mobilizace z horninového prostředí pomocí emulzifikace) a dostupný (metabolicky využitelný) mikroorganismy biodegradačními procesy).

Rozšířeným stimulačním základem je aplikování malých množství synteticky vyráběných látek s povrchovou aktivitou – surfaktantů, tj. látek, které ve své molekule mají polární i nepolární část. Z ekotoxického hlediska se však synteticky vyráběné surfaktanty považují za látky s vyšší perzistencí, se schopností přežívat v prostředí a mimo jiné působit negativně na jinou biotu v závislosti na dávce.

Biosurfaktanty

Alternativním řešením se ukazuje být aplikace biologických surfaktantů, pří-

rodních látek, jež produkují různé organismy buď v rámci své strategie přežití a vybudovat si konkurenční výhodu (inhibiční efekt na jinou formu bioty) anebo přímo z důvodů překonání fázového rozhraní s cílem produkovat mikromicely pro usnadnění transportu nepolárních látek v rámci překonávání buněčných membrán nebo jejich zpřístupnění extracelulárnímu enzymovému útoku.

V rámci uvažovaného využití biologických surfaktantů na kontaminovaných lokalitách se nabízejí dvě možnosti aplikace. První je náhrada dostupných syntetických surfaktantů využívaných jako činidla pro promývání zemin nebo jako

snahách o co největší minimalizaci nákladů stále ekonomicky poměrně náročná, zejména kvůli nákladům na extrakci a purifikaci výsledného produktu.

Alternativou je proto použití celého výstupu produkční kultivace – tedy kultivačního média s vyprodukovaným biologickým surfaktantem a biomasou produkčního kvasinkového kmene. Výhodou takového uspořádání je kombinace solubilizačního efektu biologického surfaktantu s podporou přirozených biodegradačních procesů a dodávkou biologického činitele, v tomto případě lipofilní kvasinku *Yarrowia lipolytica* nebo *Candida bombicola*.


Oba kvasinkové kmeny jsou schopné využít a následně degradovat široké spektrum nepolárních kontaminantů, zejména ropných látek.

Na druhou stranu je nutné vyřešit kultivaci přímo na místě případné aplikace, zejména pak zajištění všech podmínek pro růst kvasinek a produkci požadovaných látek a sterilitu.

Promývací média aplikovaná v podobě kultivačního média s vyprodukovaným biologickým surfaktantem a biomasou produkčního kvasinkového kmene jsou dále v textu označována jako YM (*Yarrowia lipolytica*, médium) a CM (*Candida bombicola*, médium). Biosurfaktanty izolované z kultivace těchto dvou kvasinkových byly nazvány YAR (produkce *Yarrowia lipolytica*) a CAN (produkce *Candida bombicola*).

Zkoušky prováděné na umělých i reálných maticích v systémech, jimiž se sleduje průběh vlastních vnitřních bioremediačních procesů, tzv. intrinsic bioremediation, podhalují pozitivní efekt na rozkladné procesy. Mezi tyto metody patří např. určení počtu mikroorganismů (optimálně jejich nárůst po aplikaci biostimulačního preparátu), respirační aktivita (produkce CO₂ dokládající metabolickou aktivitu přítomné půdní mikroflóry), fluorescenční analýza podílu živých a mrtvých buněk (určení reálného zastoupení životaschopných mikroorganismů ve vzorku), úbytek akceptorů elektronů (důkaz metabolické aktivity mikroorganismů), stanovení dehydrogenázové aktivity (DHA, ekotoxikologický test určující míru oživení půd a jejich mikrobiální aktivity, dehydrogenázy jsou esenciálními složkami enzymatického aparátu mikroorganismů).


Specializovaná inovativní společnost



EPS
biotechnologie

Ekologie, Průzkum, Sanace

Zakázkový vývoj inovativních technologií
Provoz výzkumných laboratoří
Odstraňování starých ekologických zátěží
Nízkonákladové aplikace biotechnologií a ISCO
Provoz dekontaminačních ploch
Průzkumy, analýzy rizika

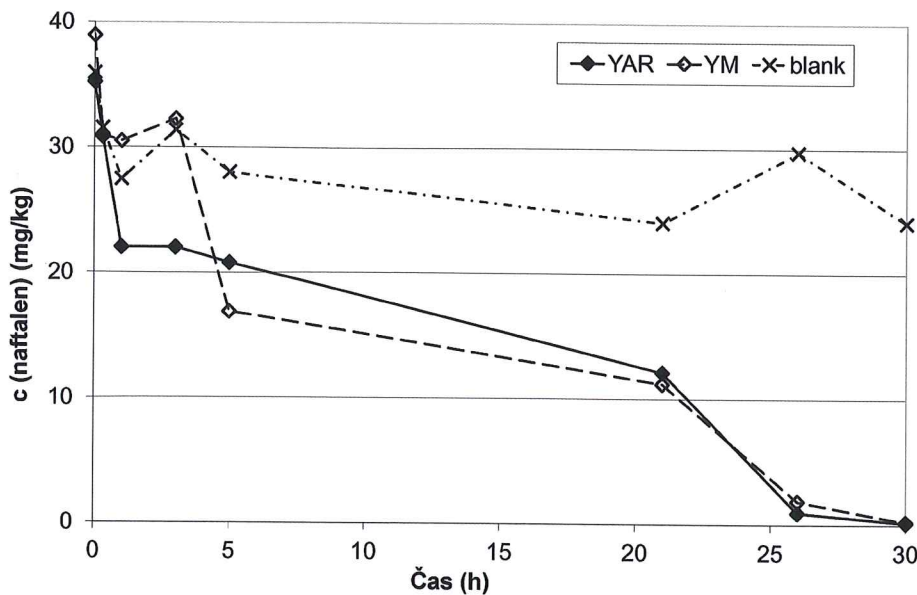


EPS, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice
+420 572 503 019, eps@epsro.cz

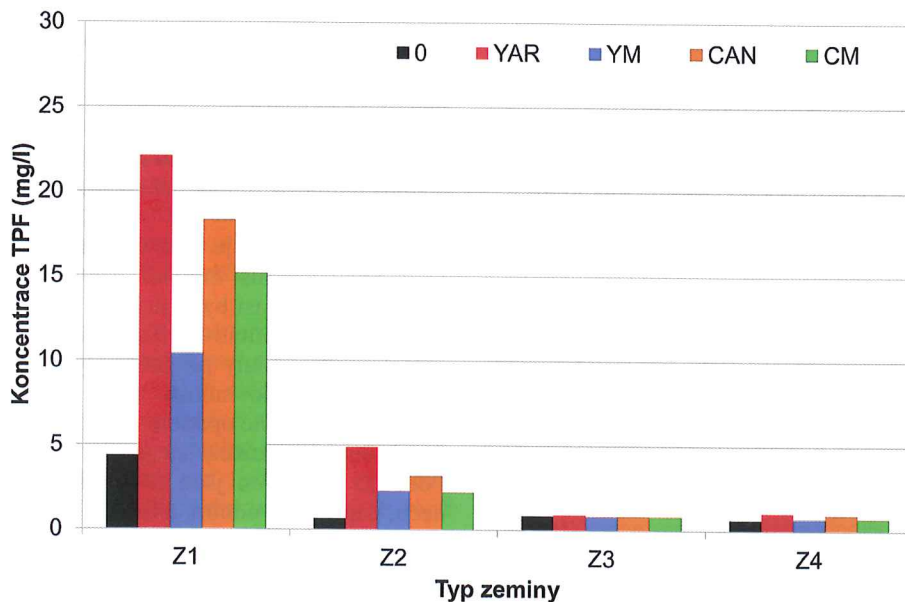
www.epsro.cz

součástí jiných roztoků určených k zasažení a následné dekontaminaci, kdy slouží jako podpurné činidlo pro uvolnění (nejčastěji ropných látek) kontaminantů z matrice.

Takové použití má své výhody, jako je jasné dávkování, snadná příprava promývacích roztoků, skladovatelnost a podobně. Na druhou stranu je tato cesta i po



Graf 1: Ukázka promývání biologickými surfaktanty: koncentrace naftalenu v promývacím roztoku v systému modelová zemina kontaminovaná naftalenem; izolovaný surfaktant YAR (koncentrace 1000 mg/l), promývací médium (s biomasou) YM a blank (destilovaná voda)



Graf 2: Test dehydrogenázové aktivity s izolovanými biosurfaktanty YAR, CAN, produkčními médii YM a CM v různých typech zemin (Z1 = běžná zemina, Z2 = jílovitý štěrtek, Z3 = jílovitý písek, Z4 = písek)

Výzkumný projekt

Společnost EPS, s. r. o. v rámci projektu ALFA TA ČR v současné době řeší problematiku produkce biologických surfaktantů lipofilními kmeny kvasinek. Na základě laboratorních testů byly vytipovány produkční kmeny kvasinek, na nichž byla následně testována optimální skladba kultivačního média i nastavení kultivačních podmínek s ohledem na produkci biosurfaktantů a na provozní možnosti v rámci biotechnologického postupu. Ve spolupráci s VŠCHT Praha pak byla vyvinuta metodika pro separaci a purifikaci těchto látek z produkčního média pro další analýzy a byla ověřena

jejich schopnost mobilizovat a solubilizovat nepolární kontaminanty (ropné uhlovodíky, polyaromáty, pesticidy) jak ve vodných roztocích, tak v zeminách. Na *grafu 1* je znázorněn průběh kolonového promývání modelové zeminy kontaminované naftalenem promývané roztokem izolovaného biosurfaktantu z kultivace *Yarrowia lipolytica* (YAR), promývacím médiem obsahujícím vyprodukované biosurfaktanty i biomasu téže kvasinky (YM) a porovnání se slepým pokusem (blank – promývání bylo realizováno pouze s destilovanou vodou). Během slepého experimentu došlo k částečnému promytí modelové zeminy,

ovšem účinnost promývání dosáhla pouze 32 % oproti 99,5 % v případě použití promývacích roztoků s obsahem biosurfaktantů.

Zároveň s testováním solubilizačních vlastností biosurfaktantů byl pomocí kombinace standardních metod pro sledování bioremediace (výše) experimentálně ověřen biostimulační efekt těchto látek na mikroflóru testovaných zemin.

Konkrétním příkladem je test DHA v různých typech zemin s různým původním mikrobiálním osídlením (*graf 2*). První typ zeminy (Z1) byla hlína s běžným mikrobiálním osídlením, druhý typ zeminy (Z2) byl jílovitý štěrtek z lokality kontaminované leteckým petrolejem s nízkým mikrobiálním osídlením. Zbylé dvě matrice (Z3 a Z4) reprezentují písčité materiály s minimálním mikrobiálním oživením.

V zeminách, kde byly zastoupeny původní mikroorganismy před aplikací promývacího roztoku s biosurfaktantem (0) došlo ke zvýšení dehydrogenázové aktivity po aplikaci promývacích roztoků všech biosurfaktantů (v kontrolních zeminách bez původního oživení ke zvýšení DHA nedošlo) a byl tak prokázán stimulační efekt biologických surfaktantů jak v podobě izolovaných produktů ve vodném roztoku (YAR a CAN), tak surových médií s kvasinkovou biomasou (YM a CM).

Biotechnologickou cestou lze tedy vyprodukovat směsi původních kultivačních médií s obsahem vyprodukovaného biosurfaktantu. Tím vzniká poměrně unikátní možnost dosažení očekávaného účinku aplikací povrchově aktivní látky z hlediska překonání výše popsaných typů problémů, ale zároveň se do prostředí dostává látka, která je mnohem snáze odbouratelná a přirozeně rozložitelná jinými metabolickými procesy. Ukazuje se, že nejenom biomasa, ale i zužitkování kultivačního média v sobě skrývají v případě použití producentů biologických surfaktantů strategii uplatnitelnou v rámci technické ochrany životního prostředí.

Poděkování

Tyto výsledky byly realizovány za finanční podpory prostředků státního rozpočtu České republiky v rámci projektu č. TA01020482 programu ALFA Technologické agentury České republiky.

Kristina Lhotská, Jiří Mikeš,
Miroslav Minařík
EPS, s.r.o.
eps@epssro.cz