

THE ROLE OF MICROBIAL COMMUNITIES IN BIOREMEDIATION

ÚLOHA MIKROBIÁLNÍHO SPOLEČENSTVA V BIOREMEDIACÍCH

Jiří Mikeš, Martina Siglová, Miroslav Minařík, Vlastimil Pištěk, Markéta Sotolářová

EPS, s.r.o. V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice, e-mail: vyvoj@epsro.cz

Abstract:

Recent research in the environmental microbiology and the knowledge resulting from the clean-up engineering based on the bioremediation show that the really powerful biological agent is the mixed community of microorganisms. Mixed community of microorganisms (which has been exposing by the selection pressure of the contaminant) may be also used as a bioaugmentation agent in bioremediation. In this paper, basic review about microbial communities in clean-up is presented. Secondary, the real application of biological agents (produced by EPS) are demonstrated as case studies, for example the biodegradation of crude oil, chlorinated hydrocarbons, waste fat, and endocrine disruptors.

Keywords:

microbial communities, biodegradation, selection pressure, bioaugmentation agent, environmental pollutants

Abstrakt

Vývoj environmentální technologie postavené na využití potenciálu mikroflóry žít v přirozených podmínkách, ale i v podmínkách modifikovaných (pozitivně – produkční biotechnologie, maximalizace výroby konkrétní látky / negativně – rozklad a detoxikační modifikace polutantů v kontaminovaném prostředí), velmi úzce souvisí s mírou poznání životních projevů těchto živých forem. Čím vyšší je míra a komplexnost těchto znalostí, tím vyšší je pravděpodobnost, že se v rámci konstrukce podmínek za účelem jejich kultivace podaří navodit takový stav, v němž budou mikrobiální projevy realizovány na optimální a efektivní úrovni. Smyslem tohoto příspěvku je poskytnout ucelenější pohled na základy environmentální (technické) mikrobiologie, ekologie¹ mikroorganismů v přirozených podmínkách a zastřešující transfer do podoby inženýrského řešení. Syntéza těchto tří stěžejních přístupů představuje vlastní vývoj *environmentální technologie*. Společným jmenovatelem příspěvku je kladení důrazu na klíčový význam role původní mikroflóry v prostředí. Ve druhé části tohoto sdělení jsou výše zmíněné teoretické předpoklady názorně ztotožněny s praktickými výstupy v podobě konkrétních environmentálních biotechnologií vyvinutých a aplikovaných společnostmi EPS, s.r.o.

Klíčová slova:

environmentální mikrobiologie, mikrobiální ekologie, transformace, transdukce, konjugace, mikrobiální společenstvo, bioremediační preparát

Úvod

Jádrem veškerých teoretických i praktických přístupů k bioremediacím je v první řadě vždy *mikrobiální činitel* – v rámci daných možností maximální poznání jeho fyziologických a metabolických schopností a limitů (vlastní mikrobiologický aspekt), odhalení vazeb jeho koexistence v prostředí ve vztahu jak k prostředí, tak k jiným biologickým složkám (ekologická rovina), a následně co nejvhodnější úsilí o transfer těchto informací do podoby technické a technologické realizace za účelem navození optimálních podmínek jeho životního prostředí v rámci daných možností, včetně objektivního monitoringu klíčových parametrů (bioinženýrské a procesní hledisko). Nezanedbatelnou skutečností, ve většině případů klíčovou a v konečném důsledku hrající stěžejní roli v ekonomice

¹ Ekologie v původním slova smyslu jako vědecké disciplíny zabývající se vztahy mezi organismem a jeho prostředím.

a efektivnosti zákroku využívajícího mikroorganismy, je původ izolace a vazby na toto prostředí, včetně koexistující jiné mikroflóry. Role *mikrobiálního společenstva* se prolíná obecně celou problematikou účinně fungujících biotechnologií v oblasti nápravy škod na životním prostředí. V následujícím textu jsou objasněny souvislosti mezi mikroorganismy v přirozeném prostředí. Dále je diskutována role tzv. selekční síly, která vyvolá zásadní změnu v prostředí a navodí stres a šoky. Ty se následně projeví kvantitativní a kvalitativní proměnou skladby původní mikroflóry tak, že druhy neschopné adaptace ze společenství vymizí a poměrově se přeskupí ty taxony, které si dokážou vytvořit konkrétní formy rezistence. Cesty, kterými je mikrobiální buňka schopná na nastalou situaci reagovat, postihuje příslušná pasáž této kapitoly. Zúročení poznatků o mikrobiologických činitelích a jejich společenstev shrnuje dílčí závěr, který se zabývá účelovou konstrukcí *biologických preparátů* pro bioremediační technologie. Uvedeny jsou dvě klíčové strategie v kontextu poznatků o chování mikrobiálních společenstev. Výhody a nevýhody, včetně konkrétních zkušeností v této rovině práce uzavírají teoretickou pasáž a vytváří vstup do problematiky konkrétních případových studií.

Komplexnost přístupu, který v oblasti aktivního nakládání s kontaminacemi v životním prostředí bioremediace představují, je znázorněna na obrázku 1. Teoretické rámce sloužící jako zdrojové soubory informací, vodítka pro optimální volbu metod, jak shromáždit dostupné poznatky a jak rozšířit znalost klíčových faktorů majících vliv na použití správných nástrojů v procesu konstrukce konkrétní biotechnologie, resp. konstrukce sanačního zákroku na bázi aplikace biologického činitele obecně, představuje v primární fázi environmentální mikrobiologie a mikrobiální ekologie. Tyto disciplíny mají výrazně interdisciplinární charakter a v mnoha ohledech se prolínají a informačně doplňují a podporují. Environmentální mikrobiologie jako podobor mikrobiologie shromažďuje poznatky o biologických činitelích, mikrobiální ekologie je disciplína o vztazích ve všech rovinách interakce biologického činitele a prostředí jeho výskytu. Zastřešujícím oborem s přímým vlivem na konstrukci vlastní technologie je bioinženýrství, které disponuje prostředky, jak technicky vytvořit optimální podmínky realizace bioremediačního zákroku.



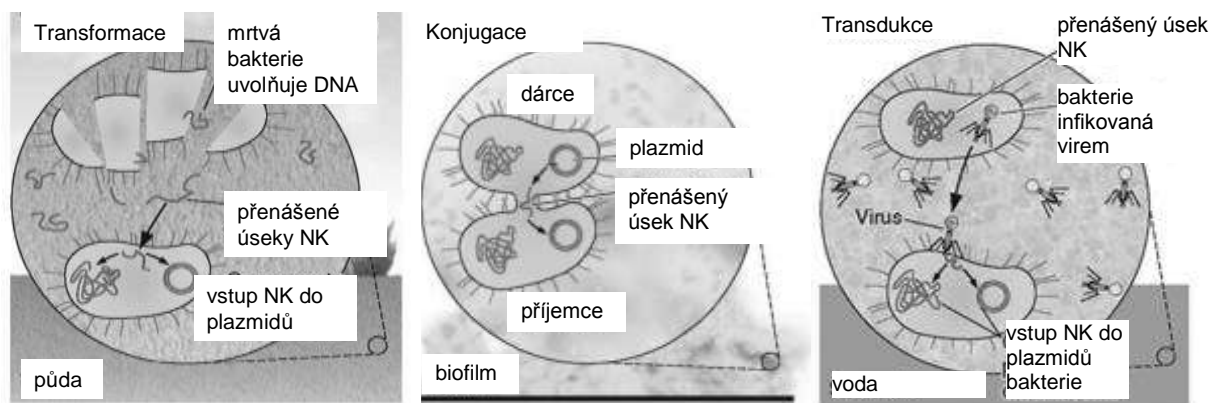
Obr. 1 Teoretická východiska pro bioremediace

Mikrobiologický činitel

Jádrem biotechnologického procesu je mikroorganismus (bakterie, kvasinka, plíseň), jež disponuje metabolickými nástroji, které mu umožní získávat v daném prostředí zdroje stavebních komponent (zejména uhlíku, dusíku, fosforu a dalších prvků) a zdroje energie. Je-li splněn tento předpoklad, představuje další klíčový faktor soubor rezistenčních mechanismů, díky nimž může účinně čelit nepříznivým vlivům prostředí do té míry, že jejich působení je fyziologicky únosné. Konkrétní příkladem může být schopnost produkce biologicky aktivní látky, díky které získá konkurenční převahu nad jinými mikrobiálními druhy s podobnými substrátovými preferencemi. Jinou situací může být přítomnost látky v prostředí, jež při určitých koncentracích vede k inhibičnímu nebo

mikrobicidnímu efektu² a schopnost mikroorganismu ji snášet. Environmentální mikrobiologie tedy studuje mikroorganismy v jejich prostředí jak za situací přirozených, tak v podmínkách, kdy nastává změna. Nežádoucími změnami bývá nejčastější vstup cizorodých látek do prostředí, tedy např. kontaminace určitého území nebo vodního zdroje nepřírodními sloučeninami v důsledku antropogenní činnosti, havárie produktovodu apod. Přítomnost kontaminantu v prostředí lze vnímat jako selekční sílu. Jinými slovy soubor faktorů, který se významným způsobem zasadí o přeskupení dosavadních biologických rovnováh a iniciuje nastolení nových. To, že k těmto změnám může dojít, je dáno vysokou plasticitou mikroflóry v prostředí. Některé schopnosti (např. syntéza konkrétního enzymu sloužícího k rozkladu polutantu) mohou být součástí základní genetické výbavy. Nicméně v mikrobiální říši se velmi výrazně uplatňuje tzv. nejaderná genetika, genetika, kde informace o syntéze konkrétního proteinu (enzymu) není zapsána v rámci jaderného genomu, ale na vnitrobuněčných součástech označovaných jako plazmidy. Tyto fragmenty nukleových kyselin jsou příčinou toho, proč se většina mikroorganismů dokáže velice rychle adaptovat na podmínky konkrétního prostředí. Největší výhodou z pohledu mikroorganismů je rychlost, jakou lze konkrétní vlastnost (tvorbu enzymu) získat. Pro environmentální biotechnologie představuje tento způsob změn metabolických vlastností velmi účinný prostředek, jak získat činitele s požadovanými vlastnostmi. Odvrácenou stranou je skutečnost, že stejně rychle, jak daný mikroorganismus uvedenou schopnost získá, ji může i pozbyt. Velmi názorným příkladem je přechovávání mikroorganismů s bioremediačním potenciálem ve sbírkových kulturách. Příčinou této situace ve většině případů bývá ztráta kontaktu s polutantem, jenž indukoval potřebu konkrétní plazmid vlastnit.

Z environmentální mikrobiologie představuje nejaderný transfer genetické informace jeden z nejdůležitějších způsobů osvojování si nových vlastností. V mikrobiologii obecně byl pro tyto přenosy zaveden termín *horizontální genový transfer*. V rámci bakterií (prokaryotních mikroorganismů) byly popsány v zásadě tři cesty, jak se úsek nukleové kyseliny kódující určitou vlastnost může dostat do buňky příjemce. Schematicky je situace znázorněna na obrázku 2.



Obr. 2 Horizontální genový transfer, volně podle T. Barkay [1]

V případě, že úsek nukleové kyseliny pochází z mrtvé buňky (lyzované) a k přenosu dochází nahodile, hovoří se o transformaci. Na tomto místě je důležité si uvědomit, že právě v této rovině může ležet jeden nejmocnějších mechanismů bioremediací založených na vnesení nepůvodních (allochtonních) kmenů do prostředí. Předpoklad, že tyto mikroorganismy ve srovnání s laboratorními podmínkami přežijí nehostinnost reálného prostředí, není velký. Nicméně právě smrt těchto biologických činitelů může obohatit plazmidy původní mikroflóru a změnit jejich metabolické procesy výrazným pozitivním způsobem. Tento děj je typický pro půdní prostředí. Sofistikovanějším způsobem přenosu je využití živého přenašeče, jímž je bakteriální virus (bakteriofág), jenž zprostředkuje přenos úseku nukleové kyseliny obdobným způsobem, jakým se např. šíří infekce. Tomuto způsobu se říká

² Inhibiční efekt zastavuje fyziologické funkce, ale nevede k bezprostřední smrti mikroorganismu (vyšší salinita), mikrobicidní efekt vyvolá smrt mikroorganismu (princip sanitačních prostředků, antibiotik), v oblasti sanačních technologií nefyziologicky vysoká koncentrace polutantu (např. toxického kovu).

transdukce. Odehrává se zejména v prostředí biofilmu, které je příznivější pro uskutečnění výše popsaného mechanismu z hlediska absence pohybu dárce a příjemce nukleové kyseliny. Posledním mechanismem je konjugace. Dochází k ní zejména ve vodném prostředí a jejím principem je přenos fragmentu nukleové kyseliny prostřednictvím konjugačního můstku - útvaru, jímž se 2 bakteriální buňky dočasně spojí po dobu uskutečnění přenosu.

Z hlediska bioremediací mají tyto poznatky klíčový význam, zejména skutečnost, že se všechny tři zmíněné procesy mohou uplatňovat napříč celým druhovým spektrem mikrobiální říše. Dokreslují obrovskou plasticitu mikroorganismů, širokou škálu aplikačních možností, ale zároveň nejednoduchost uchopení biotechnologie jako pouhého nástroje, který se použije pro vyřešení daného environmentálního problému. Vždy je nutné konkrétní sanační zákrok na platformě bioremediace konstruovat s ohledem na veškeré dostupné souvislosti a preferovat cestu na principu *tailor-made technology*³.

Mikrobiologické společenstvo

Jak je patrné z předchozích slov, role mikrobiálního společenstva je větší, než si sanační technologové v mnoha případech připouštějí. Tento fakt potvrzuje i dynamický nárůst studií v uplynulých letech, které se zabývají problematikou přirozeného biofilmu. Tato mikrobiální konsorcia představují jedinečnou ukázkou pojetí mikroorganismů jako „mnohobuněčného celku“ tvořeného různými mikrobiálními druhy s propracovanými strategiemi přežití a koexistence v prostředí v podobě upoutaných populací. Mikrobiální společenstvo v kontextu konstrukce vhodného bioremediačního preparátu nabývá o to důležitějšího významu, má-li být maximálně užitečným veškerý potenciál mikroorganismů, jenž je doposud člověku znám. Na úsvitu bioremedičních technologií v 60. letech minulého století byla intenzivně ražena teorie pokusit se nalézt univerzálního biologického činitele. Tyto přístupy bývají spojovány s výrazem „(super)bug“⁴ a se jménem George M. Robinson, který v době, kdy působil na pozici petrochemického inženýra kalifornské ropné společnosti, objevil a později propracoval principy bioremedičních technologií, zejména tzv. *bioaugmentace*⁵. Postupem času se ukázalo, že mikroorganismy sice disponují mnoha rozkladnými a transformačními schopnostmi, nicméně málokdy jsou veškeré přítomny v rámci jediného druhu (taxonu), s určitostí lze říci, že téměř nikdy. Z těchto důvodů se při konstrukci bioremedičních preparátů začaly uplatňovat dva zcela odlišné přístupy, které mají společného jmenovatele v podobě znalostí z oboru známého jako mikrobiální ekologie. V prvním se začal klást značný důraz na potřebu uzpůsobit a posílit vlastnosti prostředí tak, aby co nejvíce vyhovovaly potřebám jak původní, tak i vnesené mikroflóry. Tyto postupy jsou označovány termínem *biostimulace* a představují zejména dodávku nutrientů, kyslíku a jiných specifických faktorů na základě poznatků z průzkumu lokality a uskutečnění rozboru profilu přítomných (původních) mikroorganismů. Ve druhém přístupu, který rovněž velmi intenzivně využívá znalosti z ekologie mikroorganismů, se zohlednil fakt, že mikroorganismy se vyskytují v prostředí ve vícedruhových populacích. Z těchto důvodů se konstrukce bioremedičních preparátů zaměřila na tvorbu umělých společenstev mikrobiálních druhů s požadovanými vlastnostmi. Testován byl jak simultánní degradační účinek, tak snaha začlenit mikroorganismy do sériového procesu, kdy metabolický odpad jednoho kmene se v rámci bioremediačního procesu stane substrátem pro další druh. Nelze říci, že některý ze zmíněných směrů je špatný. Ukazuje se, že efektivní biotechnologie pro životní prostředí využívá superpozici dostupných poznatků a jedině tímto způsobem je možné dosáhnout vytčených cílů a naplnit účel aplikací těchto technologických prostředků, tedy proměnit kontaminovanou lokalitu za minimalizace nákladů a zohlednění časových kritérií v lokalitu, kde přinejmenším bude dosaženo státní správou požadovaných sanačních limitů.

Konstrukce environmentální biotechnologie

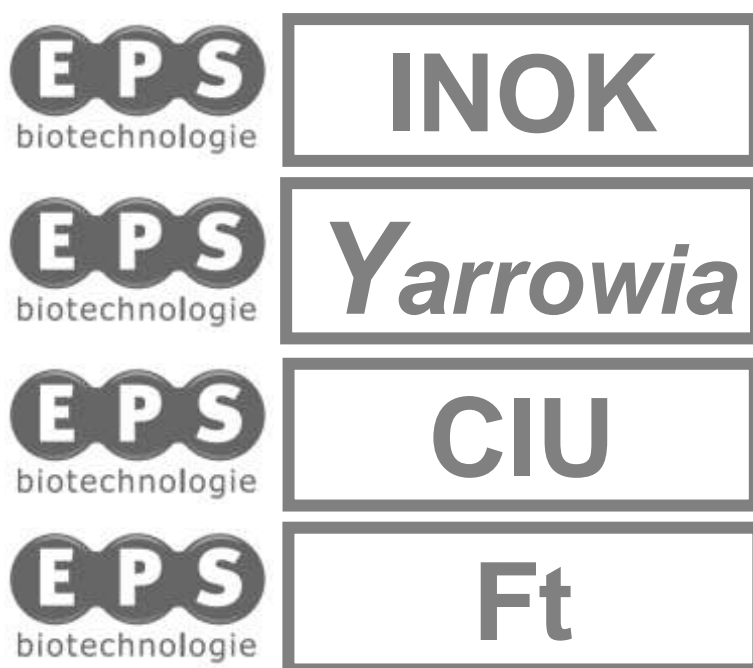
³ *Tailor-made* technologie jsou technologie konstruované „na míru“ konkrétních požadavků v místě jejich aplikace.

⁴ Bug je označení americké angličtiny pro mikroorganismus, zejména patogenní.

⁵ Bioaugmentace je vnesení mikroorganismu do kontaminovaného prostředí s úmyslem posílit spektrum původní mikroflóry a intenzifikovat rozkladné procesy.

Faktory, které jsou zohledňovány jak při konstrukci bioremediačního činidla, tak ve fázi řešení studie proveditelnosti, se velmi často týkají formy přítomnosti mikrobiálního činitele. Jinými slovy, zda technologii koncipovat jako jednodruhovou, nebo ji vystavět na bázi určitého mikrobiálního společenstva. Existence výskytu mikroorganismů v přirozeném i modifikovaném prostředí (kontaminovaném) je vždy spjata s otázkami, jakým způsobem se ustavila rovnováha v tomto biologickém systému a jaké ekologické vazby a zákonitosti v tomto výseku prostředí panují, popř. který typ strategie jednotlivými přítomnými druhy byl zvolen za účelem jejich přežití. Tento soubor informací představuje velmi hodnotnou platformu, na jejímž základě lze konstruovat účinné biologické systémy pro nápravu škod na životním prostředí.

V tomto příspěvku budou krátce představeny některé technologie, které jsou již prověřeny aplikacemi a byly do nich promítnuty poznatky získané z pilotních testů a z analýzy dat získaných v místě zákroku. Na obrázku 3 jsou znázorněna loga nabízených technologií aktivní bioremediace kontaminovaných lokalit. Důležité je zdůraznit, že veškeré uvedené vyhovují zdravotním a hygienickým normám v rámci české legislativy.



Obr. 3 EPS INOK (bioremediace ropných látek), EPS Yarrowia (bioremediace ropných a jiných nepolárních substrátů), EPS CIU (bioremediace halogenovaných uhlovodíků) a EPS Ft (bioremediace kontaminace estery kyseliny ftalové)

Konstrukce environmentální biotechnologie se opírá o potřebu znát biologického činitele (mikrobiální ekologie, environmentální mikrobiologie), být schopen ho opatřit (izolace v prostředí vs. sbírkový kmen) a sestavit strategii aplikace (bioinženýrství) tak, aby byly splněny hlavní cíle: snížení koncentrace polutantu v ošetřovaném prostředí, za minimalizace nákladů a dodržení legislativního rámce.

Nejstarší je technologie biologického rozkladu ropných uhlovodíků (ukázka technologie využívající potenciál mikroorganismů vyselektovaných na lokalitě s příslušným typem kontaminace) EPS INOK. Původní autochtonní taxony byly natolik dlouho exponovány selekčním tlakem ropné kontaminace, až se jejich schopnost aktivovat metabolický aparát a obstarávat si zdroje uhlíku a energie z ropy staly jejich stabilní schopností. Jejich hlavní výhodou je vysoká odolnost širokému spektru chemických, fyzikálních a biologických vlivů. Na tomto příkladu lze demonstrovat užitečnost provádění analýzy mikrobiálního profilu kontaminované lokality, neboť ve většině případů představuje toto prostředí bohatý reservoir kmenů s unikátními vlastnostmi. Z hlediska mikrobiální ekologie se podařilo sestavit

společenství 3 kmenů, ve kterém dominantní úlohu sehrává zástupce rodu *Pseudomonas*. Úloha dvou zbývajících kmenů (zástupci pigmentotvorných rodů bakterií) není rozhodně zanedbatelná, neboť se jedná o bakterie s výraznou schopností tvorby barviv, jež jsou signálem schopnosti produkovat biologické surfaktanty na bázi tzv. rhamnolipidů⁶, tedy látek, které zvyšují polární charakter uhlovodíků a usnadňují transport prostředím i do blízkosti výskytu hydrolyticky štěpících enzymů.

Technologie EPS Yarrowia je ukázkou monodruhového biologického preparátu. Představuje originální přístup k dekontaminaci zátěže nepolárními polutanty prostřednictvím metabolických schopností kvasinkového druhu. V této technologii se zúročují poznatky petrochemické mikrobiologie, která ukázala, že eukaryotní mikroorganismy se dovedou mnohem lépe vypořádat se substráty nepolární povahy díky vyšší produkci vhodných povrchově aktivních látek, exkreci hydrolytických enzymů a dostupnosti efektivnějších buněčných přenašečových systémů.

EPS CIU označuje technologii biodegradace chlorovaných uhlovodíků, kde bylo konsorcium zvoleno na základě sestavení vhodného společenstva sbírkových kmenů disponujících bioremediačním potenciálem vůči uvedenému druhu polutantu. Tento biologický preparát tvoří 3 stěžejní taxony, které taxonomicky náleží ke skupině *Actinobacteria*. Její zástupci mají specifické enzymové vybavení a odlišnou strukturu buněčné stěny, která pro ně představuje ochrannou bariéru před toxickým účinkem polutantu (halogenované uhlovodíky), jež zároveň dokážou využívat jako svůj zdroj uhlíku a energie. V případě aplikace tohoto preparátu je nezbytné velmi precizně monitorovat aplikační oblast a zvolit vhodnou distribuci živin a kosubstrátu⁷, včetně nízké koncentrace dodávky vzduchu. Jinými slovy klást důraz na biostimulační hledisko procesu.

Poměrně originální technologií bioremediace je biopreparát pro aktivní dekontaminaci ložisek esterů kyseliny ftalové a dalších látek ze skupiny endokrinních disruptorů, EPS Ft. Jedná se o dvoutaxonové společenstvo v rámci biopreparátu, které tvoří zástupci ze skupiny již zmíněné skupiny *Actinobacteria*, konkrétně rody *Rhodococcus* a *Kocuria*. Jejich metabolický potenciál je předurčuje, aby byly schopny biologickou cestou snižovat kontaminaci látek používaných jako změkčovače plastů. Podrobněji byla technologie popsána v publikaci [2], kde je zdůrazněno aplikační rozpětí tohoto biologického preparátu.

Společnost EPS, s.r.o. zahajuje letos pětiletý projekt v rámci programu TIP (MPO), jehož těžištěm je ucelený přístup k výzkumu a vývoji bioremedičních preparátů, zefektivnění transferu poznatků a zdokonalení informačních souborů o faktorech ovlivňujících biologické činitele a jejich schopnosti. Výstupem by mělo být portfolio biopreparátů s tržním potenciálem určené pro nápravu škod na životním prostředí prostředky bioremediace (kontaminace antropogenními polutanty).

Závěr

Smyslem příspěvku bylo zprostředkovat jiný úhel pohledu na sanační metody, jejichž principy vycházejí z možností biologických činitelů (mikroorganismů), dále zdůraznit úlohu ekologických vazeb v konsorciích a v neposledním, upozornit na komplexnost bioremedičních prostředků (vliv úpravy prostředí, selekční síly, typu matrice). V neposlední řadě vyvolat zájem o tuto problematiku a oslovit další potenciální uživatele těchto nástrojů pro nápravu škod na prostředí v duchu trvale udržitelného rozvoje.

⁶ Rhamnolipidy jsou sloučeniny s polární i nepolární součástí molekuly, které díky tomuto ambivalentnímu charakteru dokážou na principu interakce nepolární část vs. nepolární část zvýšit rozpustnost uhlovodíků ropy a podobných sloučenin. Tvoří je sacharid a mastné kyseliny a jsou biologicky odbouratelné.

⁷ Kosubstrát je substrát primárně využívaný mikroorganismem, díky jehož rozkladu se vytváří enzymy s nízkou substrátovou specifitou schopné paralelně rozkládat i polutant, nicméně bez energetického profitu pro daný kmen.

Použitá literatura

- [1] BARKAY, T., A B.F. SMETS. (2005): Horizontal gene flow in microbial communities: synthesis across scientific disciplines. ASM News, Sept.
- [2] SIGLOVÁ, M.A KOL. (2009): Bioremediace polutantů ze skupiny endokrinních disruptorů – vývoj technologie od laboratoře po reálnou aplikaci. Sanační technologie XII