

ADAPTAČNÉ ODOZVY BAKTERIÁLNYCH KMEŇOV NA ENVIRONMENTÁLNY STRES SPÔSOBENÝ PRÍTOMNOSŤOU TOXICKÝCH ORGANICKÝCH ZLÚČENÍN

SLAVOMÍRA MURÍNOVÁ^{a,b}, HANA DUDÁŠOVÁ^a, LUCIA LUKÁČOVÁ^a, KATARÍNA LÁSZLOVÁ^a a KATARÍNA DERCOVÁ^a

^a Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, ^b Výskumný ústav vodného hospodárstva, Nábřežie arm. gen. L. Svobodu 5, 812 49 Bratislava
murinova@vuvh.sk

Došlo 2.8.12, prijaté 17.10.12.

Kľúčové slová: adaptácia, baktérie, bioremediácia, masťné kyseliny, membrána, stres

Obsah

1. Organická kontaminácia a nevyhnutnosť jej odstránenia
2. Bioremediačné stratégie
 - 2.1. Úspešnosť bioaugmentácie a zvýšená rezistencia bakteriálnych degradérov
3. Bakteriálna bunka a environmentálny stres
 - 3.1. Saturácia membrány
 - 3.2. Cis/trans izomerizácia
 - 3.3. Nárast syntézy kardiopolipínu
 - 3.4. Zmeny v cyklopropánových a vetvených masťných kyselinách
 - 3.5. Anaeróbne baktérie
4. Záver

1. Organická kontaminácia a nevyhnutnosť jej odstránenia

Každý rok dochádza k čoraz väčšiemu znečisťovaniu životného prostredia v dôsledku ľudskej činnosti. Človek pre uľahčenie svojho života objavuje stále nové a nové chemické zlúčeniny, ktoré však majú často negatívne účinky na biotu. Sú potrebné aj kvôli enormnému nárastu populácie, ktorá kladie požiadavky na zefektívnenie poľnohospodárstva a priemyslu. Ide najmä o produkciu látok, ktoré sa prirodzene v prostredí nevyskytujú a sú príčinou environmentálneho znečistenia. Tieto antropogénne látky, najmä aromatické a chlórované zlúčeniny, patria medzi nebezpečné kontaminanty v dôsledku ich vysokej priemyselnej produkcie, bioakumulácie, toxicity a perzistencie. Mnohé z nich patria k nebezpečným škodlivinám, čiže

látkam s vlastnosťami poškadzujúcimi zdravie človeka. Z tohto dôvodu sa v súčasnosti venuje veľký záujem o vývin rôznych technológií pre odstránenie týchto kontaminantov z prírody.

Pozornosť odbornej verejnosti sa presúva z rôznych fyzikálno-chemických metód odstraňovania polutantov z prostredia k biologickým metódam sanácie. Tieto metódy sú ekonomickou a najmä ekologickou alternatívou k dodnes používaným technológiám. Ich veľkou výhodou je aj to, že ich možno použiť pri relatívne nízkej koncentrácii kontaminantu v znečistenej zložke životného prostredia (napr. mg kg⁻¹ pôdy). Medzi bioremediačné technológie patrí fyto- a mykoremediácia slúžiaca najmä na akumuláciu ťažkých kovov rastlinami, mykoremediácia využívajúca huby pre odstránenie toxických látok a najmä bakteriálna degradácia. Posledná z nich využíva bakteriálne kmene s degradačnou schopnosťou na odstránenie kontaminujúcich látok z prostredia. Nevyhnutnou podmienkou úspešnej biodegradácie organických kontaminantov je nielen schopnosť daného bakteriálneho kmeňa rozkladať kontaminanty, ale aj jeho schopnosť prežiť v kontaminovanom prostredí a kolonizovať ho.

Rôzne organické kontaminanty majú na mikroorganizmy žijúce v takomto prostredí negatívny vplyv. Najvýraznejšie sa to prejavuje v inhibícii rastu a v zmenách v cytoplazmovej membráne, ktorá ako prvá prichádza do kontaktu s kontaminantom. Pri príliš toxickom vplyve organických látok na bunku dochádza k strate degradačnej schopnosti a k smrti bunky. Väčšina z organických kontaminantov (polycyklické aromatické uhľovodíky (PAU), polychlórované bifenyly (PCB), bifenyly, pesticídy, pentachlórfenol (PCP) a pod.) je hydrofóbná, toxická a ťažko rozložiteľná (perzistentná). Tieto kontaminanty sú nebezpečné z hľadiska ich schopnosti kumulovať sa v živých organizmoch a následne ich poškodzovať. Na zdravie človeka pôsobia veľmi negatívne najmä v dôsledku svojich karcinogénnych a teratogénnych účinkov. Sú veľmi významnými kontaminantmi životného prostredia, pretože mnohé z nich znečistili mnohé územia, ktoré sa dnes radia medzi tzv. „staré environmentálne záťaž“². V posledných rokoch je pozorovaná snaha o sanáciu daných území, avšak aplikácia remediačných technológií je v súčasnosti skôr problémom ekonomickým ako ekologickým.

2. Bioremediačné stratégie

V rámci bioremediácie je uvažovaná hierarchia *in situ* prístupov dekontaminácie v súvislosti s meniacou sa komplexitou typov kontaminantov a ich distribúcie, podmienok týkajúcich sa špecifického miesta (cena a časové obmedzenia) a regulačných faktorov – legislatívy, ktoré jednoznačne určujú, ako má byť remediácia realizovaná³.

Najmenej invazívnym prístupom je prirodzená atenuácia. Predpokladá sa, že v prostredí existujú kmene mikroorganizmov alebo konzorcií, ktoré sa dokážu s kontamináciou vysporiadať a aj keď biodegradácia kontaminantov prebieha pomaly, je kontinuálna a je ju možné a potrebné monitorovať.

Druhým výberom v bioremediačnej hierarchii je stimulácia degradačnej aktivity prirodzených populácií dekontaminovať dané chemikálie, znečisťujúce látky. Biostimulácia, ako sa tento proces nazýva, je aplikovaná v prípade, ak sa degradiujúca populácia síce vyskytuje v kontaminovanej zóne, ale živiny a ďalšie podmienky sú nedostatočné pre mikrobiálnu aktivitu. Kyslík je často limitujúcim substrátom a jeho zavedenie vo forme peroxidu vodíka, čistého kyslíka, alebo vzduchu môže v mnohých prípadoch indukovať prítomnú prirodzenú populáciu degradovať ciele chemikálie. Biostimulácia je najčastejšie akcelerovaná prídavkom živín, rastových faktorov, surfaktantov a/alebo fyzikálnymi procesmi⁴. Výsledkom je zmožnutie prirodzeného mikrobiálneho konzorcia a posilnenie na stabilný a účinný dekontaminačný systém.

Tretím výberom v hierarchii bioremediačných technológií *in situ* je bioaugmentácia. Zahŕňa prídavok exogénnych organizmov, ako aj pôvodných adaptovaných mikroorganizmov s požadovanými katabolickými schopnosťami do kontaminovaného prostredia za účelom zvýšenia degradácie cieľového kontaminantu. Použitie tejto techniky je vhodné, ak prirodzená atenuácia alebo biostimulácia sú nevhodné alebo nefungujú.

Pri výbere vhodných kultúr mikroorganizmov je potrebné brať do úvahy nasledovné vlastnosti: rýchly rast, ľahkú kultiváciu, odolnosť voči kontaminantom, schopnosť prežívať v širokom rozsahu environmentálnych podmienok, teda aj za nepriaznivých okolností^{5,6}. Pri degradácii hydrofóbných kontaminantov je vhodné, ak degradiujúci kmeň produkuje zároveň biosurfaktanty a tým ich solubilizuje, robí ich rozpustnejšími a sprístupňuje mikroorganizmom^{7,8}.

Neexistujú mikroorganizmy alebo skupiny univerzálne použiteľné pre bioaugmentáciu, nakoľko geologické, environmentálne a iné podmienky v jednotlivých lokalitách sú veľmi odlišné. Mnohé mikroorganizmy sú však metabolicky rôznorodé. Posilnenie kontaminovanej zóny je možné uskutočniť viacerými prístupmi. Je možné využiť bioaugmentáciu individuálnymi kmeňmi (baktérie alebo huby), bioaugmentáciu mikrobiálnym konzorciom (zmes baktérií prípadne húb) alebo bioaugmentáciu s imobilizovanými bunkami (enkapsulovanými alebo imobilizovanými adsorpciou). V uzavretých systémoch je možné využiť aj bioaugmentáciu geneticky konštruovaných resp. modifikovaných organizmov (GMO), pričom sa najčastejšie využívajú geneticky modifikované baktérie.

Pri bioaugmentácii sa využívajú aj nasledovné typy mikroorganizmov⁹:

- konštitutívne varianty degradačných mikroorganizmov,
- kmene deficientné resp. rezistentné na adhéziu,

- degradačné organizmy so zvýšenými energetickými rezervami,
- geneticky modifikované mikroorganizmy.

2.1. Úspešnosť bioaugmentácie a zvýšená rezistencia bakteriálnych degradérov

Na biodegradáciu aromatických zlúčenín v kontaminovaných pôdach sa najčastejšie využívajú gram-negatívne baktérie a tiež huby. V mnohých prípadoch boli mikrobiálne konzorciá účinnejšie ako čisté kmene v dôsledku skutočnosti, že intermediáty katabolických dráh jedného kmeňa môžu byť ďalej degradované metabolickými dráhami iného kmeňa. Samozrejme v prítomnosti viacerých kmeňov, či už prirodzených alebo exogénnych je potrebné počítať buď so synergizmom alebo antagonizmom a tým s kompetíciou o substrát a živiny. Úspech bioaugmentácie výrazne závisí najmä od schopnosti kmeňa prežiť v kontaminovanom prostredí, od zachovania degradačnej schopnosti – expresie požadovaných enzýmov pre cieľový kontaminant (najčastejšie sa jedná o dioxygenázy, alebo peroxidázy, napr. pri degradácii chlórovaných arómatov) a od biodostupnosti kontaminantu pre mikroorganizmus, čiže od ich vzájomného kontaktu¹⁰. Veľmi cenné je aj poznanie zloženia, priestorovej a časovej distribúcie a populačnej dynamiky autochtónnych komunít vo vzorkovaných spoločenstvách za účelom predikcie potenciálneho účinku pôdnej inokulácie¹¹.

Od bioaugmentovaných kmeňov sa vyžaduje odolnosť voči samotnému kontaminantu, ale aj odolnosť voči ďalším inhibítorm. Samotná odolnosť ako uvádzame v ďalšom texte, významne súvisí s adaptačnými zmenami baktérií prebiehajúcimi v bunkovej membráne, prvom mieste kontaktu bunky s xenobiotikom (znečisťujúcou látkou). Čím menšie sú zmeny v membráne, tým sa javí kmeň odolnejší voči nepriaznivému vplyvu okolia.

3. Bakteriálna bunka a environmentálny stres

Odhýlky od optimálnych podmienok prostredia vyvolávajú v mikroorganizme celý rad procesov, ktorých hlavným cieľom je minimalizovať ich negatívny dosah. Adaptačné procesy prebiehajú synchronizovane tak, aby bunka pri čo možno najnižšom výdavku energie zabezpečila svoje hlavné fyziologické funkcie. Keďže membrána je prvým miestom kontaktu bunky a okolia, sú zmeny v tomto kompartmente nevyhnutnou podmienkou adaptácie celého mikroorganizmu a teda aj jeho schopnosti prežiť. Medzi základné mechanizmy adaptácie na environmentálny stres patria zmeny v zastúpení mastných kyselín (MK) vo všetkých lipidických frakciách a najmä membránových lipidoch. Membrána baktérií pozostáva najmä z fosfatidyletanolamínu (75 %), fosfatidylglycerolu (15–20 %) a kardiolipínu (5–10 %). U niektorých baktérií na vývojo-vo vyššom stupni sa v membráne nachádza fosfatidylcholín, ktorý im dodáva špecifické vlastnosti, ako je schopnosť fotosyntézy alebo viazania dusíka¹².

Rôzne organické kontaminanty sú známe svojou schopnosťou zvyšovať membránovú fluiditu¹³. U tekutín je fluidita definovaná ako prevrátená hodnota dynamickej viskozity, pričom viskozita tekutín sa vysvetľuje predstavou o posúvaní rovnobežných vrstiev tekutiny, pri ktorom sa uplatňuje vnútorné trenie medzi týmito vrstvami¹⁴. Fluidita membrány súvisí s pohyblivosťou molekúl lipidov v nej. Táto pohyblivosť zahŕňa laterálnu difúziu a rotáciu molekúl, segmentálne pohyby reťazcov a obvykle pomalý „flip-flop“ pohyb medzi oboma vrstvami lipidickej dvojvrstvy. Fluidita membrány úzko súvisí s jej usporiadanosťou. Vo väčšine prípadov, ak je fluidita membrány vyššia, tak je membrána neusporiadanejšia, a teda náchylnejšia na prienik rôznych nepolárnych látok z prostredia do vnútra bunky. Zmeny vo fluidite membrány spôsobujú aj štrukturálne zmeny bielkovín nachádzajúcich sa v nej. To sa prejavuje v zmenenej funkcii enzýmov, receptorov a prenášačov¹⁵.

Nárast membránovej fluidity môže viesť k poškodeniu bunky. Spúšťa nešpecifickú priepustnosť s inhibíciou membránovej aktivity. Protónová priepustnosť, ktorá je dôležitým parametrom životaschopnosti bunky, je tiež ohrozená. Organické zlúčeniny kontaminujúce všetky zložky životného prostredia sú schopné včleniť sa do vnútornej vrstvy biologických membrán, čo vedie k napučeniu cytoplazmovej membrány a k stratám jej fyziologickej funkcie a aktivity v dôsledku nekontrolovaného protónového priesaku. Medzi tieto látky patria aj PAU, PCB, bifenyl, PCP, benzén, toluén a iné. Ide najmä o hydrofóbne toxické látky, ktorých hodnota rozdeľovacieho koeficientu log P je v rozmedzí 1–5 (cit.¹⁶). Na zabránenie straty bunkovej integrity a membránovej funkcie používajú baktérie tieto mechanizmy:

- saturácia mastných kyselín – zvýšenie množstva nasýtených mastných kyselín na úkor nenasýtených,
- izomerizácia *cis* nenasýtených mastných kyselín na ich *trans* izoméry,
- nárast syntézy kardiopolipínu pre dlhodobú adaptáciu v stacionárnej fáze,
- zvýšená syntéza *iso* formy mastných kyselín na úkor *anteiso* formy za zníženia membránovej fluidity,
- zníženie množstva *anteiso* mastných kyselín a zvýšenie nasýtených,
- zvýšenie cyklopropánových a vetvených mastných kyselín.

3.1. Saturácia membrány

Nárast nasýtených mastných kyselín v membráne má za následok zvýšenú toleranciu k toxickým zlúčeninám (cit.^{9,17–20}). Zvýšenie saturácie sa prejavuje tak, že alkylové reťazce mastných kyselín vo fosfolipidoch membrány sa približia k sebe a tým narastá rigidita membrány a teda aj tolerancia k prítomnosti hydrofóbnych látok. Tento mechanizmus zvyšuje usporiadanosť membrány a vedie k zníženiu jej fluidity, čo má za následok zníženie fluidizačného efektu spôsobeného vysokými koncentraciami hydrofób-

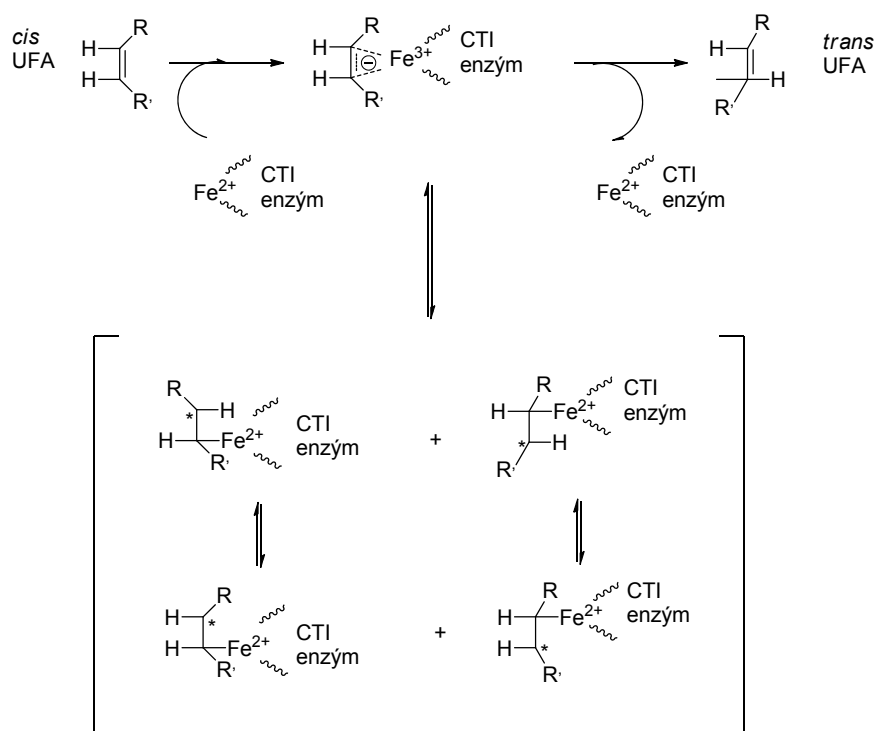
nych toxických látok, rovnako ako aj vysokých teplôt. Zmeny v stupni saturácie potrebujú *de novo* syntézu membránových lipidov, ktoré sú rastovo a energeticky závislé. To znamená, že iba energeticky závislá syntéza saturovaných mastných kyselín vedie k nárastu nasýtenia u baktérií, čo môže byť príčina, prečo zmeny v stupni nasýtenia boli pozorované iba u rastúcich buniek²¹. V prítomnosti takých koncentrácií rôznych toxických látok, ktoré viedli k úplnej inhibícii rastu, nasýtenosť mastných kyselín nebola pozorovaná u žiadneho z testovaných kmeňov²². Nárast v stupni membránovej saturácie je jedným z hlavných bakteriálnych adaptačných mechanizmov v prítomnosti subletálnej koncentrácie hydrofóbnej toxikkej látky^{13,23,24}. Princíp účinku tohto mechanizmu je v rozdielnej teplote skupenskej premeny. Dlhoreťazcové nasýtené mastné kyseliny majú pomerne vysokú teplotu topenia (kyselina palmitová 63 °C). Prislúchajúca mono-nenasýtená mastná kyselina v *cis* konfigurácii dvojitej väzby má teplotu topenia podstatne nižšiu (kyselina palmitolejová 0 °C). Toto tuhé skupenstvo mastných kyselín dáva membráne vyššiu pevnosť a teda aj možnosť pôsobiť proti fluidizačnému efektu organických látok^{25–27}.

3.2. *Cis/trans* izomerizácia

Niektoré bakteriálne kmene (najmä rody *Pseudomonas* a *Vibrio*) sú schopné prispôbiť sa zmenám ich membránovej fluidity izomerizáciou *cis* nenasýtených mastných kyselín na *trans* izoméry. Tieto dve formy mastných kyselín majú odlišnú priestorovú štruktúru. Z tohto dôvodu premena *cis* formy na *trans* vedie k zníženiu membránovej fluidity a takisto k zníženiu stresu²⁸. *Trans* mastné kyseliny sú formované riadenou izomerizáciou z komplementárnej *cis* konfigurácie s dvojitou väzbou v nezmenenej pozícii²⁹.

Cis-trans izomerizácia nie je závislá na raste, a tak je možná aj v nerastových podmienkach spôsobených vysokými koncentraciami toxických látok na rozdiel od zmien v saturácii. Koreluje s toxicitou a množstvom organickej látky v membráne. Z pozorovaní rodu *Pseudomonas* sa zistilo, že nie je energeticky závislá a teda nevyžaduje molekuly ATP alebo iné kofaktory ako NADPH a glutatión a funguje aj bez potreby *de novo* syntézy lipidov³⁰. Izomeráza je enzým kódujúci *cis-trans* izomerizáciu. Cti sekvencia, zodpovedajúca za lokalizáciu *cis-trans* izomerázy v medzimembránovom priestore, bola nájdená u všetkých šiestich skúmaných kmeňov rodu *Pseudomonas*³¹. Z tohto dôvodu iba dvojité väzby mastnej kyseliny v určitej hĺbke membrány môže dosiahnuť aktívne miesto tohto enzýmu a byť transformovaná³². Bolo dokázané, že tento enzým má *N*-terminálnu hydrofóbnú signálnu sekvenciu, ktorá sa odštiepi, keď je enzým vpravený do cieľového medzimembránového priestoru.

Mechanizmus izomerizácie bol opísaný v roku 2004 (cit.³³). Ide o riadený atak dvojitej väzby nenasýtenej mastnej kyseliny elektrofilným železným iónom (Fe³⁺), ktorý vedie k uvoľneniu elektrónu z dvojitej väzby a vzniku radikálového komplexu kovalentne viazaného na železo.



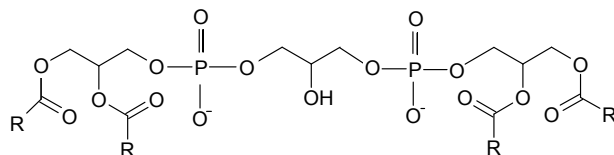
Obr. 1. Mechanizmus *cis/trans* izomerizácie nenasýtených mastných kyselín (UFA) (modifikované podľa ³³)

Ako sprievodný jav dochádza k nárastu pozitívneho náboja na jednom viazanom uhlíku, ktorý môže byť stabilizovaný negatívne nabitou aminokyselinou v enzýme. Oxidujúce sa železo je kovalentne viazané s jedným z dvoch atómov uhlíka z dvojitej väzby. Preto je enzým – substrátový komplex formovaný okolo elektrofilného železa, ktoré poskytuje hemová doména izomerázy. Ten odstráni elektrón z dvojitej väzby, čím dôjde k prešmyku sp^2 konfigurácie na sp^3 . Následne je dvojité väzba obnovená v polohe *trans* (obr. 1). Energetický rozdiel medzi *cis* a *trans* konfiguráciou je približne $3,1 \text{ kJ mol}^{-1}$. Je to dôkaz, že izomerizácia v tomto poradí je exotermická reakcia, ktorá nepotrebuje energiu na svoj priebeh. Zmeny v zložení mastných kyselín v dôsledku stresových podmienok by mohli byť použité ako indikátor environmentálnych zmien. Takisto by sa dali aplikovať v detekcii toxicity prostredia ako aj environmentálneho stresu počas *in situ* alebo *ex situ* bioremediačného procesu²¹.

3.3. Nárast syntézy kardiolípinu

Kardiolípin je minoritným prvkom bakteriálnej a mitochondriálnej membrány (obr. 2). Môže zachytávať protóny a viazať sa s proteínmi. Kardiolípin syntáza radikálne zvyšuje adaptovateľnosť membránových lipidov na prítomnosť organických rozpúšťadiel. Nárast objemu kardiolípinu (difosfatidylglycerolu) je známym adaptačným mechanizmom. Dlhodobá adaptácia na toxické rozpúšťad-

lá je okrem zmeny fosfolipidov dosiahnutá aj aktiváciou efluxnej pumpy, čo umožňuje bunkám efektívnejšiu možnosť adaptácie a opráv³⁴. Pre dlhodobú adaptáciu fosfolipidovej časti membrány je stimulovaná produkcia kardiolípinu u mnohých druhov *Pseudomonas*. U baktérii bola opísaná iba *de novo* syntéza kardiolípinu³⁵. Prokaryotá menia obsah svojho kardiolípinu v závislosti od ich fyziologického stavu a fázy rastu. Počas exponenciálnej fázy môžeme nájsť v bunke iba stopové množstvá tohto fosfolipidu, avšak jeho syntéza sa zvyšuje s prechodom do stacionárnej fázy, osmotickým stresom alebo ako odpoveď na stratu energie. Kardiolípin stimuluje zmeny vo fyzikálnych vlastnostiach membrán. Napríklad už malé množstvo kardiolípinu znižuje laterálne interakcie medzi membránovými vrstvami, čo vedie k zníženiu energie potrebnej na natiahnutie membrány a preto stimuluje tvorbu membránového zvrásnenia³⁶. Z tohto dôvodu je najväčší výskyt kardiolípinu pozorovaný na póloch bunky. Hoci presný mechaniz-



Obr. 2. Štruktúra membránového kardiolípinu baktérii³⁸

mus účinku kardiopolipínu pri ochrane bunky nie je známy, Wallbrunn a spol.³⁷ zistili, že *cis-trans* izomeráza nie je schopná úplne nahradiť jeho funkciu v prítomnosti toxikkej látky. Bakteriálny mutant neschopný syntézy kardiopolipínu prežil iba pri nižších koncentráciách použitého polutantu.

3.4. Zmeny v cyklopropánových a vetvených mastných kyselinách

Pri skúmaní vplyvu polycyklických aromatických uhlíkovodíkov a fenolu na celkové lipidy a membránové lipidy rôznych bakteriálnych kmeňov sa zistilo, že množstvo cyklopropánových mastných kyselín (C17-CP a C 19-CP) prudko narástlo po pridaní vyššej koncentrácie kontaminantu^{9,17,39,40}. V našich prácach sa tieto zistenia potvrdili pri skúmaní vplyvu polychlórovaných bifenylov^{20,41}. Funkcia týchto mastných kyselín v adaptácii na stres nebola doteraz objasnená. Napriek tomu mnohí autori opisujú priaznivý účinok týchto kyselín na prežitie nielen v prítomnosti rôznych organických látok, ale aj nepriaznivých podmienkach spôsobených tlakom, teplotou a salinitou prostredia^{27,42,43}.

V prácach viacerých autorov bol opísaný nárast vetvených mastných kyselín po pridaní environmentálneho stresora. Zmeny vetvených mastných kyselín využívajú vo veľkej miere G^+ a minoritne G^- baktérie. Tieto mastné kyseliny sa syntetizujú *de novo* za spotreby energie. Prekurzorom pre *iso* párne reťazce je valín, pre *iso* nepárne reťazce leucín a pre *anteiso* reťazce je izoleucín. Základnou zmenou vetvených MK po pridaní toxických látok je zmena *anteiso* polohových izomérov na *iso*. *Iso* formy sa môžu pevnejšie zoskupiť vedľa seba ako *anteiso* mastné kyseliny v dôsledku svojej priestorovej štruktúry. Tým dôjde k pevnejšiemu zomknutiu mastných kyselín v membráne a zhoršeniu prieniku organických látok do vnútra bunky. K zmene fluidity membrány prispieva aj rozdielna teplota skupenskej premeny týchto kyselín. *Iso* formy majú vyššiu teplotu topenia ako *anteiso* (pre kyselinu C 15:0 *iso* je to teplota 51,7 °C, kým pre C 15:0 *anteiso* je to 23 °C)⁴⁴. Zvýšenie syntézy *iso* formy na úkor *anteiso* má u G^+ baktérií rovnaký účinok ako transformácia *cis* nenasýtených mastných kyselín na *trans* izoméry u G^- baktérií.

3.5. Anaeróbne baktérie

Informácie o adaptácii anaeróbných baktérií sú pomerne kusé. Najvýznamnejší pokrok v tejto oblasti urobili Duldhardt a spol.²², ktorí skúmali vplyv toxických látok na rôzne druhy anaeróbov. Sulfát redukujúce baktérie obsahujú iba v malej miere nenasýtené a vo veľkom množstve vetvené mastné kyseliny. Z tohto dôvodu tieto baktérie menia svoju membránovú fluiditu zvyšovaním množstva nasýtených mastných kyselín na úkor vetvených. Proces zmien v bunke je výrazne pomalší v porovnaní s aeróbnymi baktériami. Keďže syntéza nasýtených aj vetvených mastných kyselín prebieha výlučne za spotreby energie, adaptačné zmeny závisia najmä na energetických možnostiach jednotlivých buniek⁴⁵.

4. Záver

Slovenská republika sa stala spolu s mnohými európskymi krajinami signatárom Štokholmského dohovoru (2001), čím sa zaviazala odstraňovať tzv. staré environmentálne záťaž z prostredia. Za účelom biologickej sanácie sa preto v súčasnosti robia v Európe aj štúdie zamerané na získanie kmeňov s degradačnou schopnosťou, zaistenie optimálnych podmienok pre prežitie týchto baktérií a možnosti ich aplikácii v praxi. Táto štúdia sa zameriava na posúdenie odolnosti bakteriálnych kmeňov voči rôznym organickým kontaminantom. Kmene, ktoré sú schopné sa svojimi adaptačnými mechanizmami prispôsobiť zmeneným environmentálnym podmienkam, môžu naďalej existovať v takto znečistenom prostredí. Tým sa stávajú potenciálne využiteľné pre účely bioremediácie. Každá bunka schopná prežiť v prítomnosti pomerne vysokej koncentrácie toxikkej látky si určitým spôsobom adaptuje svoju cytoplazmovú membránu. Súčasťou bioremediačnej stratégie je aj zaistenie optimálnych podmienok pre rast týchto kmeňov. Veľmi dôležitým faktorom pre prežitie je aj fáza rastu, v ktorej sa bunka dostala do kontaktu s kontaminantom. Prežitie autochtónnych, ale aj allochtónnych (inokulovaných) kmeňov možno podporiť aj prídavkom živín v podmienkach biostimulácie. V našich štúdiách sme využili na podporu rastu a tiež zvýšenú expresiu bifenyldioxygenázy prídavok terpenov vo forme prírodných matric, ktoré ich obsahujú (napr. brečtanové listy alebo borovicové ihličie). Pozorovali sme zvýšený rast, zvýšenie biodegradácie PCB a zníženie adaptačných zmien prebiehajúcich v membráne testovaných kmeňov izolovaných z kontaminovanej pôdy a sedimentov⁴¹. Takéto odolné mikroorganizmy je vhodné použiť pre praktickú aplikáciu – pre bioaugmentáciu (či už ide o autochtónny alebo allochtónny kmeň) kontaminovaných oblastí.

Práca je financovaná z grantového programu VEGA (No 1/0734/12) MŠ SR.

LITERATÚRA

1. Kočan A., Petřík J., Jursa S., Chovancová J., Drobná B.: *Chemosphere* 43, 596 (2001).
2. Paluchová K.: *Enviromagazín* 14, 8 (2009).
3. Unterman R., DeFlaun M., Steffan R., v knihe: *Biotechnology* (Rehm H. J., Reed G., ed.), zv. 11b, kap. 3, druhé vydanie. Wiley-Verlag, Weinheim 2000.
4. Sadowsky M. J., Turco R. F., v knihe: *Bioremediation of Contaminated Soil* (Adriano D. C., Bollag J. M., Frankenberger W. T., Jr., Sims R. C., ed.), str. 457. American Society of Agronomy Inc., Madison 1999.
5. Singer A. C., van der Gast C. J., Thompson I. P.: *Trends Biotechnol.* 23, 74 (2005).
6. Thompson I. P., van der Gast C. J., Ciric L., Singer A.C.: *Environ. Microbiol.* 7, 909 (2005).
7. Moran A. C., Olivera N., Commendatore M., Esteves J. L., Sineriz F.: *Biodegradation* 11, 65 (2000).
8. Gentry T. J., Rensing C., Pepper I. L.: *Crit. Rev. Envi-*

- ron. Sci. Technol. 34, 447 (2004).
9. Mroziak A., Cycoń M., Piotrowska-Seget Z.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64, 86 (2010).
 10. Rehm H. J., Reed G. (ed.): *Biotechnology*, zv. 11b, druhé vydanie. WILEY-Verlag, Weinheim 2000.
 11. Dercová K.: *Odpady* 6, 19 (2012).
 12. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (ed.): *Biochemistry*, šieste vydanie. W. H. Freeman and Company, New York 2006.
 13. Heipieper H. J., Weber F. J., Sikkema J., Keweloh H., de Bont J. A. M.: *TIBTECH* 12, 409 (1994).
 14. Brdička R., Dvořák J. (ed.): *Základy fyzikální chemie*, druhé vydanie. Academia, Praha 1997.
 15. Lenaz G., v knihe: *Biomembranes* (Gh. Benga, J.M. Tager, ed.) str. 93. Springer Verlag, Berlín 1985.
 16. Sikkema J., de Bont J. A. M., Poolman B.: *Microbiol. Rev.* 59, 201 (1995).
 17. Čertík M., Dercová K., Sejáková Z., Findřová M., Jakubík T.: *Biology* 58, 1111 (2003).
 18. Dercová K., Čertík M., Mařová A., Sejáková Z.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54, 251 (2004).
 19. Pepi M., Heipieper H. J., Fischer J., Ruta M., Volterrani M., Focardi S. E.: *Extremophiles* 12, 343 (2008).
 20. Zorádová S., Dudášová H., Lukáčová L., Dercová K., Čertík M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 1019 (2011).
 21. Heipieper H. J., de Bont J. A. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4440 (1994).
 22. Duldhardt I., Gaebel J., Chrzanowski L., Nijenhuis I., Härtig C., Schauer F., Heipieper H. J.: *Microbial. Biotechnol.* 3, 201 (2010).
 23. Keweloh H., Diefenbach R., Rehm H. J.: *Arch. Microbiol.* 157, 49 (1991).
 24. Gutierrez J. A., Nichols P., Couperwhite I.: *FEMS Microbiol. Lett.* 176, 213 (1999).
 25. Hazel J. R., Williams E. E.: *Prog. Lipid Res.* 29, 167 (1990).
 26. Cronan J. E.: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 202 (2002).
 27. Kabelitz N., Santos P. M., Heipieper H. J.: *FEMS Microbiol. Lett.* 220, 223 (2003).
 28. Heipieper H. J., Meinhardt F., Segura A.: *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 1 (2003).
 29. von Wallbrunn A., Richnow H. H., Neumann G., Meinhardt F., Heipieper H. J.: *J. Bacteriol.* 185, 1730 (2003).
 30. Diefenbach R., Keweloh H.: *Arch. Microbiol.* 162, 120 (1994).
 31. Junker F., Ramos J. L.: *J. Bacteriol.* 181, 5693 (1999).
 32. Heipieper H. J., Waard P., Meer P., Killian J. A., Isken S., Bont J. A. M., Eggink G., Wolf F. A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 541 (2001).
 33. Heipieper H. J., Neumann G., Kabelitz N., Kastner M., Richnow H. H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 285 (2004).
 34. Pinkart H. C., White D. C.: *J. Bacteriol.* 179, 4219 (1999).
 35. Schlame M.: *J. Lipid Res.* 49, 1609 (2008).
 36. Nichols-Smith S., The S. Y., Kuhl T. L.: *Biochem. Biophys. Acta* 1663, 82 (2004).
 37. von Wallbrunn A., Heipieper H. J., Meinhardt F.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 179 (2002).
 38. Ramos J. L., Duques E., Rodriguez-Hervas J. J., Godoy P., Haidours A., Reyes F., Fernandez-Barrero A.: *J. Biol. Chem.* 272, 3887 (1997).
 39. Mroziak A., Labuzek S., Piotrowska-Seget Z.: *Microbiol. Res.* 159, 87 (2004).
 40. Mroziak A., Labuzek S., Piotrowska-Seget Z.: *Microbiol. Res.* 160, 149 (2005).
 41. Zorádová-Murínová S., Dudášová H., Lukáčová L., Čertík M., Šilharová K., Vrana B., Dercová K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1375 (2012).
 42. Denich T. J., Beaudette L. A., Lee H., Trevor S. J. T.: *J. Microbiol. Methods* 52, 149 (2003).
 43. Chihib N. E., Tierny Y., Mary P., Hornez J. P.: *Int. J. Food Microbiol.* 102, 113 (2005).
 44. Kaneda T.: *Microbiol. Rev.* 55, 288 (1991).
 45. Unell M., Kabelitz N., Jansson J. K., Heipieper H. J.: *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 138 (2007).

S. Murínová, H. Dudášová, L. Lukáčová, K. Lázlová, and K. Dercová (*Department of Biotechnology, Faculty of Chemical and Food Technology, Bratislava*): **Adaptation Responses of Bacterial Strains to Environmental Stress Caused by the Presence of Toxic Organic Compounds**

A prospective method for decontamination of the environment is bioremediation using bacteria or fungi and phytoremediation using plants to degrade pollutants. The bacteria used for biodegradation must be able to colonize the contaminated area. Some of them have developed efficient adaptation mechanisms to survive under adverse conditions. Most adaptive mechanisms are associated with membrane fluidity and lipid-phase stability. In the presence of organic compounds bacteria decrease membrane fluidity to maintain cell viability. This can be achieved by increased cis/trans isomerization, membrane saturation and alternation of branched and cyclopropyl fatty acids.