ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

# POPIS OBJAVU K DIPLOMU ČÍS. 22

Prihlásené 13. 11. 75 (PO 74-75)

Právo prednosti od 31. 03. 74

Zverejnené: Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie (NDR) 14, 2, 1974, 123—134

Udelené 17. 12. 80

Vydané 15. 12. 81

DT 663.11

Autorky objavu: KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ ANNA, RNDr., DrSc., BRATISLAVA a HAVELKOVÁ MARIE, MUDr., CSc., VYŠKOV

Názov objavu: **Nový druh mikroorganizmu Prototheca hydrocarbonea**

Predmet objavu:

1. Jav spočívajúci v existencii nového druhu heterotrófnej riasy, nazvanej autormi Prototheca hydrocarbonea.
2. Vlastnosti nového druhu tejto bezfarbej riasy, uvedenej v bode 1, spočívajúce v schopnosti rásť za podmienok heterotrófnej výživy, využívať D-xylózu a n-alkány.

Objav sa týka nového druhu mikroorganizmu, Prototheca hydrocarbonea.

Z ropného kalu boli izolované rôzne kmene mikroorganizmov, ktoré boli schopné rásť na uhľovodíkoch ako jedinom zdroji uhlíka. Dva z týchto kmeňov sme určili ako bezfarebné riasy. Fylogenetický pôvod bez farebných rias nebol doposiaľ vysvetlený. Pôvodne ich pokladali za zelené riasy, ktoré stratili schopnosť vytvárať chlorofyl. Zistilo sa však, že bezfarebné plastidy (leukoplasty) neobsahujú škrob, ale iný polysacharid. Voříšek a Kocková-Kratochvílová (Voříšek J., Kocková-Kratochvílová A., Ztschr. allg. Mikrobiol. 15: 203—209, 1975) zistili, že rezervný polysacharid u izolovaných kmeňov je galaktanového typu. Turner a Lloyd (Turner G., Lloyd D., Biochem. J. 99: 550, 1967) už pred tým dokázali v tomto polysacharide tiež glukózu a manózu. Tak sa dokázalo, že je podstatný rozdiel medzi zelenou riasou Chlorellou a jej mutantmi a medzi týmto typom heterotréfnej riasy, Prototheca.

Dva kmene izolovanej Prototheca boli označené CCY 70-1-1 a CCY 70-1-2 a udržiavajú sa na sladinovom agare, ale tiež na agaroch z ovocných a zeleninových štiav. Kmene boli podrobne identifikované testami popísanými Kockovou-Kratochvílovou a spol. (Kocková-Kratochvílová A., Slávíková E., Jensen V., J. gen. Microbiol. 104: 257, 1978) alebo v niektorej skoršej práci tu citovanej. Morfológia buniek, ich rozmnožovanie a životný cyklus ukázali, že ide o riasu. Životný cyklus Prototheca hydrocarbonea znázorňuje obr. 1: **1** — Osemspórový askus, **2** — po prasknutí bunkovej steny sa spóry uvoľnia, **3** — spóry narastajú (niekedy už v asku) a sú zrnité, **4** — zrnitosť buniek je pravidelná, pri stenách sú väčšie zrnká ako v strede buniek, **5** — zrnitosť je len pri stenách buniek. K tomuto procesu je potrebný prístup kyslíka. **6** — v asku sa vytvoria štyri spóry, neskór 8 až 16, príp. aj viacej a cyklus sa opakuje. **7** — zo štádia 5 sa môžu vytvoriť aj menšie asky s dvoma spórami, medzi ktorými sa vytvárajú prepážky. Tieto asky sú hrubostenné. **8** — steny askov praskajú a uvoľňujú spóry. **9** — spóry narastajú v zrnité bunky. **10** — tieto bunky sústredia zrnitosť ku stenám, na čo potrebujú kyslík, a prechádzajú vo viacspórový askus. Niekedy dvojspórový askus (7) prejde na štvorspórový a viacspórový. Hlavný cyklus sa potom vždy opakuje. Celý tento životný cyklus a štruktúru jednotlivých bunkových štádií podrobne popísali a elektrón opticky dokumentovali autorky (Kocková-Kratochvílová A., Havelková M., Ztschr. allg. Mikrobiol. 14: 123—134, 1974). Morfologické vlastnosti jednotlivých štádií životného cyklu sú uvedené v tab. 1.

V tekutom živnom prostredí vytvárajú objavené druhy usadeninu a pri povrchu tenkú kožku. Kolónie sú na pevnom agare okrúhle, mäkké, biele s mierne matným povrchom.

Novopopísaný druh sa odlišuje od dosiaľ popísaných druhov rodu Prototheca tým, že rastie v širokom rozmedzí teplôt, od 8 °C až do 42 °C. Nekvasí žiadny cukor. Asimiluje glukózu, galaktózu, xylózu a inozitol, ale neasimiluje maltózu, sacharózu, laktózu, sorbózu, melibiózu, rafinózu, melezitózu, trehalózu, celobiózu, maltotriózu, dextrín, ribitol, arabinitol, erytritol, galaktitol, glucitol, ani manitol. Neasimiluje $KNO_3$ ani lyzín, ale síran amónny a peptón. Asimiluje n-alkány s reťazou $C_{14}$—$C_{16}$. Fyziologické vlastnosti oboch izolovaných kmeňov uvádza tab. 2, tab. 3 a tab. 4.

Popísané kmene potrebujú, aby v prostredí boli prítomné vitamíny. Sú slabo osmofilné (v 60 % sacharóze nerastú a v 10 % glukóze s 5 % NaCl len slabo. Znášajú dobre inhibítory lignínového charakteru a karamelizačné produkty v hydrolyzátoch rôznych poľnohospodárskych odpadov. 2%ná kyselina mliečna inhibuje nový druh od 0—11 % rastu. Ureázu neprodukujú. Aktivita katalázy je veľká. Želatínu neskvapalňujú. Kmene sú pomerne odolné voči aktidiónu v koncentrácii 0,1 až 500 $\mu$g na kotúčik.

Až do popísania nového druhu Prototheca hydrocarbonea bolo známych päť druhov tohoto rodu bezfarebných rias: Prototheca filamenta (ktorá bola neskoršie ako druh bezfarebných rias zrušená a preradená k hubám), Prototheca stagnora, Prototheca zopfii, Prototheca moriformis a Prototheca wickerhamii. Tu popísaný nový druh patrí k skupine prototék, ktoré neasimilujú sacharózu, trehalózu ani laktózu. Z týchto piatich druhov je v tejto skupine jedine Prototheca zopfii.

Nový druh sa odlišuje od Prototheca zopfii tým, že využíva xylózu k rastu a ako zdroj energie, čo P. zopfii nie je schopná. Nový druh má tiež väčšie rozmery buniek, sporangií aj spór. Rastie dobre pri teplote 42 °C.

Tabuľka 1

Mikrometrické údaje o bunkách nového druhu Prototheca hydrocarbonea

| Bunky | CCY 70-1-1 | CCY 70-1-2 |
|---|---|---|
| Priemerne dĺžky buniek | 7,40 ± 0,43 μm | 7,72 ± 0,36 μm |
| Priemerné šírky buniek | 5,77 ± 0,36 μm | 6,60 ± 0,37 μm |
| Pomer mezi dĺžkou a šírkou | 1,28 | 1,15 |
| Priemerné dĺžky autospór v osemspórových sporangiách | 3,70 ± 0,24 μm | 3,89 ± 0,19 μm |
| Priemerné šírky autospór v osemspórových sporangiách | 2,18 ± 0,16 μm | 2,96 ± 0,18 μm |
| Pomer mezi dĺžkou a šírkou autospór v osemspórových sporangiách | 1,35 | 1,31 |
| Priemerná dĺžka autospór v dvojspórových sporangiách | 3,75 ± 0,20 μm | 3,80 ± 0,22 μm |
| Priemerná šírka autospór v dvojspórových sporangiách | 2,00 ± 0,17 μm | 2,15 ± 0,21 μm |
| Pomer medzi dĺžkou a šírkou autospór v dvojspórových sporangiách | 1,87 | 1,79 |
| Korelačný koeficient medzi dĺžkou a šírkou buniek | 0,449 | 0,510 |

Tabuľka 2

Asimilácia rôznych C-zdrojov u nového druhu Prototheca hydrocarbonea

| C-zdroj | CCY 70-1-1 | CCY 70-1-2 |
|---|---|---|
| Glukóza | + | + |
| Fruktóza | + | + |
| Galaktóza | + | + |
| Maltóza | — | — |
| Sacharóza | — | — |
| Laktóza | — | — |
| Melibióza | — | — |
| Trehalóza | — | — |
| Celobióza | — | — |
| Melicitóza | — | — |
| Rafinóza | — | — |
| Sorbóza | — | — |
| Fukóza | — | — |
| Xylóza | + | + |
| 1-arabinóza | — | — |
| Ribitol | — | — |
| Arabinitol | — | — |
| Glucitol | — | — |
| Galaktitol | — | — |
| Manitol | — | — |
| Erytritol | — | — |
| Inositol | + | + |
| Maltotrióza | — | — |
| Maltotetraóza | — | — |
| Nižšie dextríny | — | — |
| Rozpustný škrob | — | — |
| Inulín | — | — |
| Glykogén | — | — |
| Hexadekán | + | + |
| zmes n-alkánov ($C_{14}$—$C_{16}$) | + | + |
| Mepasin ($C_8$—$C_{22}$) | — | — |

Vysvetlenie:
— nerastie
+ rastie

Tabuľka 3

Asimilácia rôznych N-zdrojov u nového druhu Prototheca hydrocarbonea

| N-zdroj | CCY 70-1-1 | CCY 70-1-2 |
|---|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ (síran amónny) | — | + |
| $KNO_3$ (dusičnan draselný) | — | — |
| Pepton | + | + |
| l-lyzín | — | — |
| tryptofán | — | — |

Fyziologické vlastnosti nového druhu Prototheca hydrocarbonea

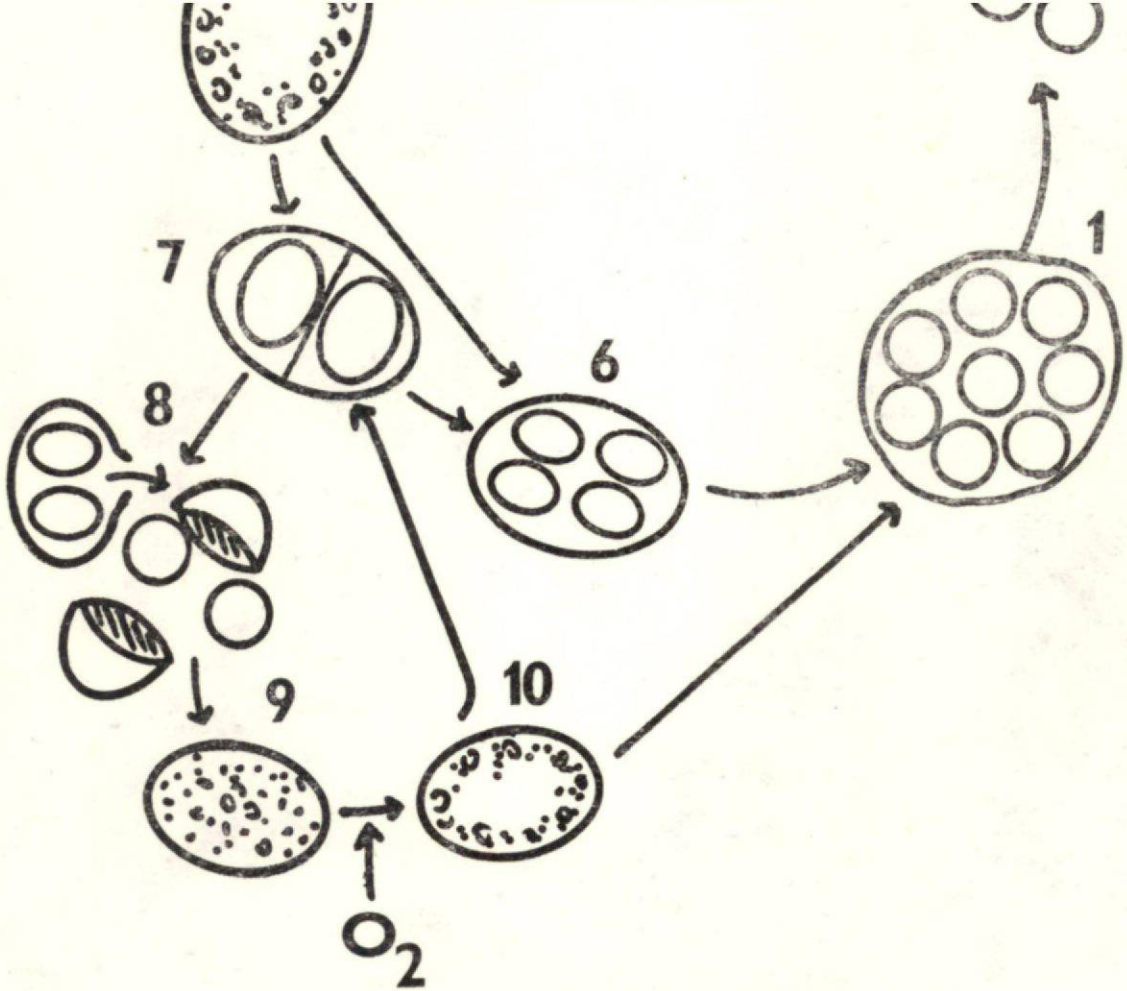
| Vlastnosti | CCY 70-1-1 | CCY 70-1-2 |
|---|---|---|
| Rast pri teplote: 5 °C | — | — |
| 28 °C | + | + |
| 42 °C | + | + |
| Rast v prostredí bez vitamínov | — | — |
| Rast v osmoticky aktívnych prostrediach: | | |
| s 60% sacharózou, | — | — |
| s 10% glukózou a 5 % NaCl | (+) | (+) |
| Inhibícia rastu 2% kyselinou mliečnou | 11 % | — |
| Test s kyselinou fosfomolybdénovou | náter biely | náter biely |
| Kvasenie cukrov | — | — |
| Štiepenie arbutínu | — | — |
| Aktivita ureázy | — | — |
| Chromatografický dôkaz štiepenia rafinózy | (+) | (+) |
| Aktivita katalázy | + | + |
| Stekucovanie želatiny | — | — |
| Vplyv 0,1—500 $\mu$g aktidiónu/disk | dobrý rast | dobrý rast |

Vysvetlenie:
— nerastie, test negatívny
\+ rastie, test pozitívny
(+) slabý rast, slabý výsledok testu

Význam novopopísaného druhu spočíva predovšetkým v tom, že môže byť vhodným modelom pre štúdium cytokinetiky. Pre toto štúdium je ideálnym objektom, pretože je to organizmus jednobunkový, dobre rastúci na bežných pôdach a má prednosti pred Chlorella v tom, že nie je ovplyňovaný svetlom. Počas životného cyklu tohoto organizmu dochádza k dvom aj viacerým za sebou nasledujúcim deleniam jadier, ale nedochádza k deleniu bunky. Cytokinéza sa môže oddeliť od procesov ako je syntéza DNA, mitóza alebo rast cytoplazmy. Okrem toho schopnosť popisovaného organizmu využívať uhľovodík má značný praktický význam pre zužitkovanie ropného odpadu, olejov a podobných látok. Schopnosť využívať xylózu je veľmi výhodná pre zúžitkovanie odpadov pri spracovaní rastlinného materiálu. Protoplazma tohoto organizmu je veľmi bohatá na uhlíkaté a dusíkaté látky a zostava aminokyselín v bielkovinách je výživove veľmi priaznivá.

Ako reprezentant nového druhu bol označený CCY 70-1-1, izolovaný z ropného kalu, uložený v Čsl. zbierke Chemického ústavu SAV v Bratislave a pod číslom RIVE 60-1-1 v zbierke Komplexného výskumného ústavu vinohradníckeho a vinárskeho v Bratislave.

Severografia, n. p., závod 7, Most


7
1
6
8
9
10
$O_2$