



Wpływ surfaktantów na biodegradację węglowodorów przy udziale bakterii gramdodatnich i gramujemnych

Ewa Kaczorek, Agnieszka Pijanowska, Andrzej Olszanowski
Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Poznańska,
Poznań

The influence of surfactants on hydrocarbons biodegradation by using Grampositive and Gramnegative bacterial strains

Summary

Pseudomonas aeruginosa and *Pseudomonas putida*, as Grampositive and *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* as Gramnegative strains were used as biological agents in biodegradation process of model mixture of hydrocarbons alone. Furthermore in the presence of the synthetic emulsifiers of polyoxyethylene alcohol and alkylglucoside derivatives, natural emulsifier of rhamnolipid derivatives and anionic surfactants were used.

Key words:

biodegradation, bacteria Grampositive, bacteria Gramnegative, surfactants, hydrocarbons.

1. Wstęp

W likwidacji skażenia środowiska naturalnego substancjami ropopochodnymi stosuje się, m.in. metody bioremediacyjne wykorzystujące bakterie do biodegradacji substancji ropopochodnych. Analiza zachowania się mikroorganizmów w miejscach skażonych ropą naftową pokazuje imponujący potencjał ich zdolności biodegradacyjnych (1). Wśród różnych grup taksonomicznych można znaleźć organizmy, które potrafią metabolizować składniki ropy naftowej. W literaturze szczególnie dużo uwagi poświęca się gatunkom należącym do bakterii, drożdży i grzybów (2-8).

Adres do korespondencji

Ewa Kaczorek,
Instytut Technologii
i Inżynierii Chemicznej,
Politechnika Poznańska,
pl. M. Skłodowskiej-Curie 2,
60-965 Poznań.

Biodegradacji związków organicznych bardzo często towarzyszy wydzielanie różnych substancji o charakterze związków powierzchniowo czynnych (2,9). Jedną z ich funkcji może być udział w zwiększaniu degradacji związków trudno rozpuszczalnych w wodzie (10,11). Różnice w budowie ściany komórkowej, których konsekwencją jest podział na bakterie gramdodatnie i gramujemne, powodują m.in. różną hydrofobowość ściany komórkowej. Jest to prawdopodobnie jeden z istotnych parametrów, który należy brać pod uwagę przy ocenie skuteczności działania bakterii w stosunku do węglowodorów, jako związków o dużej hydrofobowości. Bakterie w obrębie jednego rodzaju i gatunku mogą także różnić się hydrofobowością (12). Ściana komórkowa bakterii gramdodatnich jest gruba i składa się w 60-100% z peptydoglikanu tworzącego sieć trójwymiarową. Dla większości bakterii z tej grupy charakterystycznym składnikiem są kwasy tejchojowe, które występują w dwóch postaciach: rybitalowy kwas tejchojowy i glicerolowy kwas tejchojowy. W skład ścian komórkowych niektórych bakterii gramdodatnich mogą także wchodzić: polisacharydy, białka, które nie tworzą struktury błonowej lub też kwasy mykolowe. Bardziej złożoną budowę posiadają natomiast bakterie gramujemne. Głównymi składnikami ściany komórkowej są: peptydoglikan i występujące w obrębie błony zewnętrznej fosfolipidy, białka i glikolipid – lipopolisacharyd (13).

W procesie bioremediacji skażeń wywołanych substancjami ropopochodnymi stosuje się często dodatkowo związki powierzchniowo czynne w celu zemulgowania węglowodorów i ułatwienia kontaktu z mikroorganizmami (11). W przeprowadzanych przez nas badaniach nad wpływem surfaktantów na biodegradację modelowych węglowodorów wskazujemy na zróżnicowaną skuteczność działania surfaktantów w obecności różnych szczepów bakterii (14,15).

Celem pracy były badania nad wpływem niejonowych i anionowych surfaktantów na biodegradację węglowodorów przy udziale bakterii gramdodatnich i gramujemnych.

2. Materiały i metody

2.1. Zestawienie stosowanych szczepów

Badania mikrobiologiczne prowadzono z czystymi szczepami bakteryjnymi:

a) bakterie gramujemne:

– *Pseudomonas aeruginosa* TK – szczep wyizolowany z gruntu skażonego ropą, profil biochemiczny – 20573067073,

– *Pseudomonas putida* – szczep wyizolowany z gleby, profil biochemiczny – 42072067073;

b) bakterie gramdodatnie:

– *Bacillus subtilis* – szczep wyizolowany z biopreparatu Enzybac, profil biochemiczny – 1706165255761100,

– *Bacillus licheniformis* – szczep wyizolowany z biopreparatu Putidoil, profil biochemiczny – 1707165671341400.

2.2. Zestawienie stosowanych związków powierzchniowo czynnych

Jako związki powierzchniowo czynne wykorzystano: niejonowe związki z grupy związków polioksyetylenowanych (AT-7, L-10, Rokanol L-9, estry metylowe kwasów kokosowych), alkiloglikozydy (Lutensol GD-70, Glukopon 650) oraz dodecylosulfonian sodu (SDS) z grupy anionowych związków powierzchniowo czynnych. Stosowano także mieszaninę naturalnych emulgatorów z grupy ramnolipidów, wytwarzanych przez szczep *Pseudomonas aeruginosa* (JBR-425), należące do grupy anionowych związków powierzchniowo czynnych. W badanych układach początkowe stężenie związków powierzchniowo czynnych wynosiło 0,0085% (poniżej krytycznego stężenia micelnego).

2.3. Metodyka badań biodegradacji węglowodorów

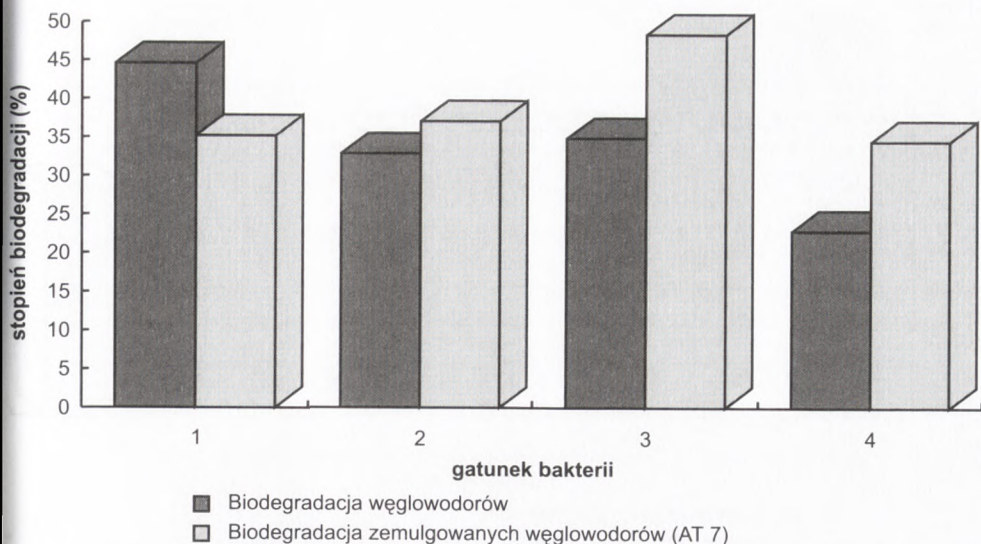
Biodegradacji poddawano modelową mieszaninę węglowodorów dodekanu (C_{12}) i heksadekanu (C_{16}) zmieszanych w stosunku wagowym 1:1, jak i zemulgowanych węglowodorów. Używano 2 ml mieszaniny węglowodorów. Stężenie związków powierzchniowo czynnych na początku eksperymentu było 0,8% w stosunku do węglowodorów.

Do 100 ml wody dodawano 42 ml roztworu bakteryjnego (stanowiącego zawiesinę określonego szczepu bakterii w roztworze 12,8 g $(NH_4)_2HPO_4$ + 2,3 g NH_4NO_3 / 1000 ml). W przygotowanym w ten sposób roztworze liczba bakterii była rzędu 10^5 - 10^6 w ml. Próby inkubowano w temperaturze 20-30°C na wytrząsarce przez 7 dni, w warunkach tlenowych, w kolbach zamkniętych korkami z waty, owiniętymi folią aluminiową.

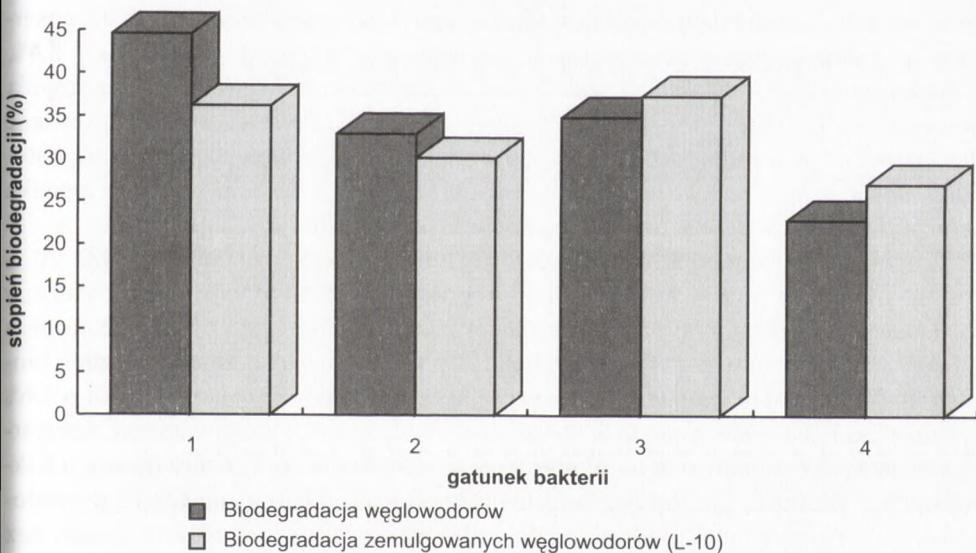
3. Wyniki i ich omówienie

Wyniki biodegradacji węglowodorów i zemulgowanych węglowodorów w obecności bakterii gramdodatnich i gramujemnych przez testowane związki powierzchniowo czynne przedstawiono na rysunkach od 1 do 9.

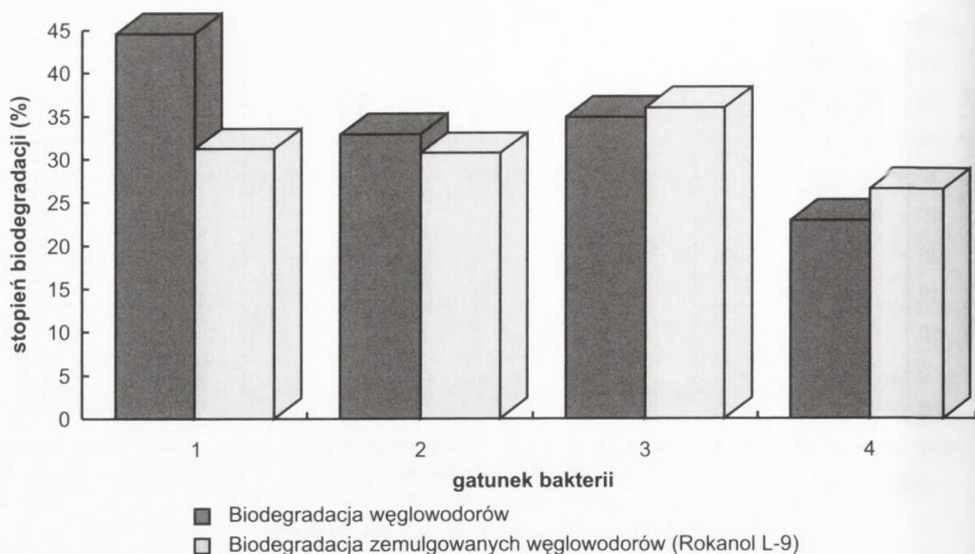
Użycie preparatu AT 7, który jest mieszaniną polioksyetylenowanego alkoholu alifatycznego i polioksyetylenowanego estru kwasu alifatycznego, wpływało korzystnie na biodegradację węglowodorów przebiegającą przy użyciu szczepów z rodzaju *Bacillus* (bakterie gramdodatnie). Stopień biodegradacji w układzie zemulgowanym dla szczepu *Bacillus subtilis* był wyższy o 13,6%, a dla szczepu *Bacillus licheniformis* o 11,5% w stosunku do układu niezemulgowanego. Dla szczepu *Pseudomonas putida* obserwowano nieznaczny wzrost stopnia biodegradacji, natomiast dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK jego obniżenie.



Rys. 1. Wpływ AT 7 na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).



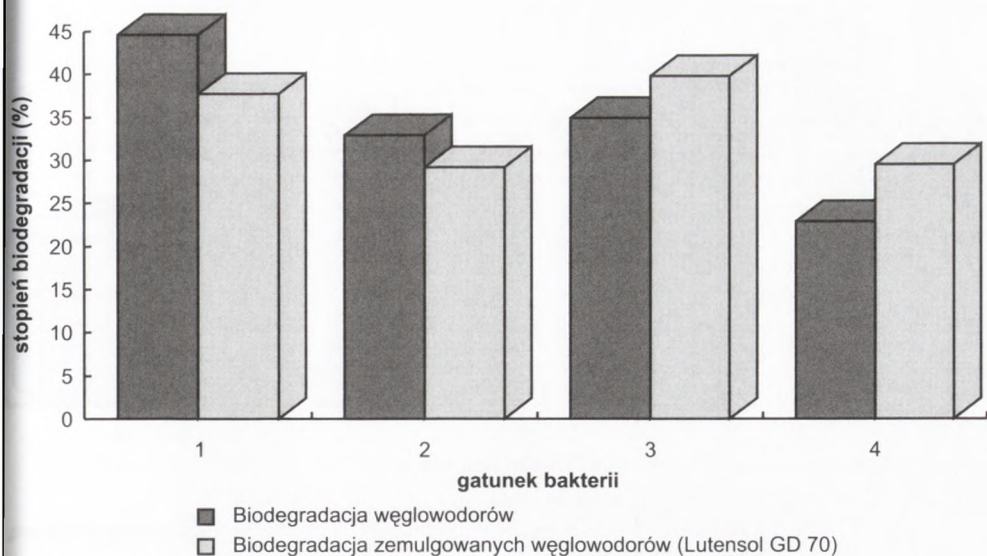
Rys. 2. Wpływ L-10 na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).



Rys. 3. Wpływ Rokanolu L-9 na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).

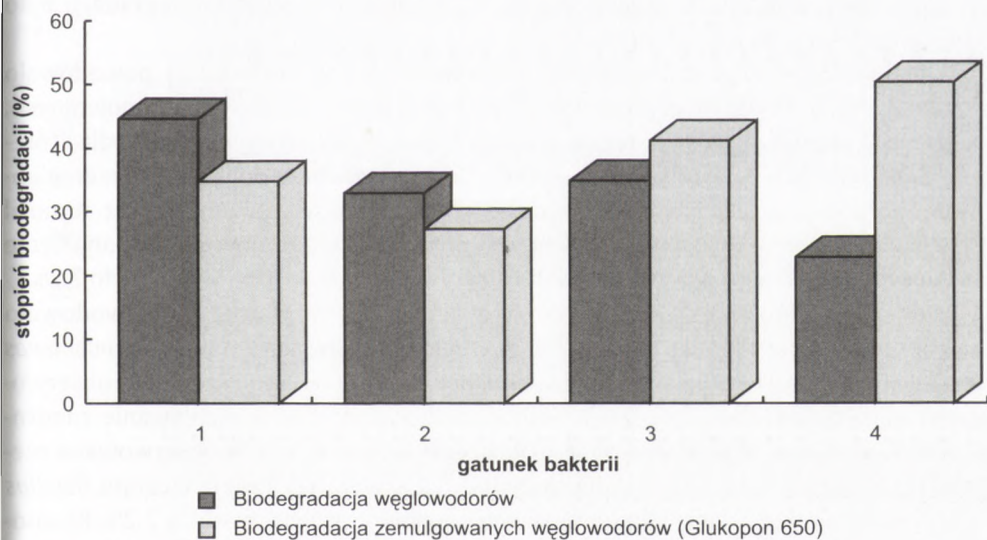
Dodanie do węglowodorów syntetycznych emulgatorów z grupy polioksyetenowych alkoholi (L-10 – rys. 2, Rokanol L-9 – rys. 3) prowadziło do obniżenia stopnia biodegradacji gdy użyto szczepów *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK i *Pseudomonas putida*. Dla szczepu *Pseudomonas putida* obniżenie biodegradacji było niewielkie i wynosiło od 2,2% (L-10) do 2,8% (Rokanol L-9). Natomiast dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK obserwowano znacznie wyższy spadek stopnia biodegradacji, który wynosi dla L-10 – 8,4%, a dla Rokanolu L-9 – 13,4%. Dla bakterii gramodatnich obserwowano wzrost stopnia biodegradacji dla obu testowanych szczepów. Dla szczepu *Bacillus subtilis* zastosowanie emulgatora L-10 powodowało wzrost stopnia biodegradacji węglowodorów o 2,5%, natomiast Rokanolu L-9 o 3,9% w stosunku do układu niezemulgowanego. W przypadku szczepu *Bacillus licheniformis* wzrost ten wynosił odpowiednio 1,1 oraz o 4,2%

Zastosowanie emulgatorów z grupy alkilopoliglukozydów (Lutensol GD 70 – rys. 4, Glucopton 650 – rys. 5) do biodegradacji węglowodorów przez szczepy *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK i *Pseudomonas putida* powodowało obniżenie stopnia biodegradacji układów zemulgowanych dla obu testowanych szczepów. Stopień biodegradacji uległ obniżeniu o 9,8% dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK i o 5,6% dla szczepu *Pseudomonas putida* w stosunku do układu niezemulgowanego. Korzystny wpływ tych emulgatorów na biodegradację węglowodorów obserwowano u bakterii gramodatnich. Szczep *Bacillus subtilis* w obecności Lutensolu GD-70 powodował wzrost stopnia biodegradacji węglowodorów o 4,9% w stosunku do układu bez emulgatora. Natomiast dla Glucoptonu 650 obserwowano wzrost stopnia biodegradacji w stosunku do układu niezemulgowanego o 6,3%. Dla szczepu *Bacillus*

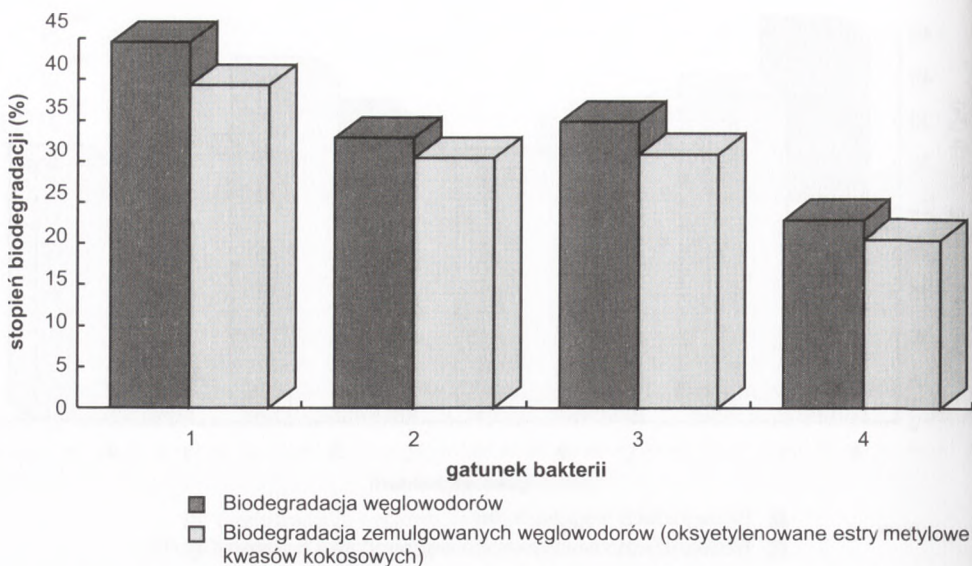


Rys. 4. Wpływ Lutensolu GD 70 na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).

licheniformis najlepsze rezultaty uzyskano dla Glukoponu 650, dla którego odnotowano wzrost stopnia biodegradacji o 17,5% w stosunku do układu niezemulgowanego. Obserwowano także dodatni wpływ Lutensolu GD 70 na biodegradację węglowodorów. Po 7 dniach biodegradacji uzyskano wzrost stopnia biodegradacji o 6,6% w stosunku do układu bez emulgatora.



Rys. 5. Wpływ Glukoponu 650 na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).

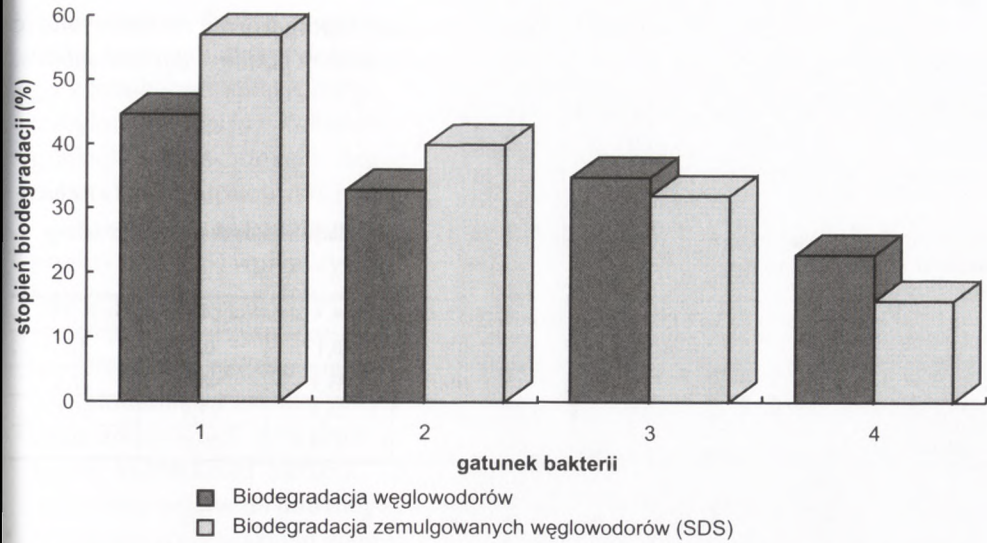


Rys. 6. Wpływ oksyetylenowanych estrów metylowych kwasów kokosowych na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).

We wszystkich testowanych układach oksyetylenowane estry metylowe kwasów kokosowych obniżały w niewielkim stopniu biodegradację w odniesieniu do układu bez emulgatora. Największy spadek zanotowano dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK – 5,3%, a dla pozostałych czterech szczepów obniżenie biodegradacji było zbliżone i wynosiło od 2,4 do 4,0%.

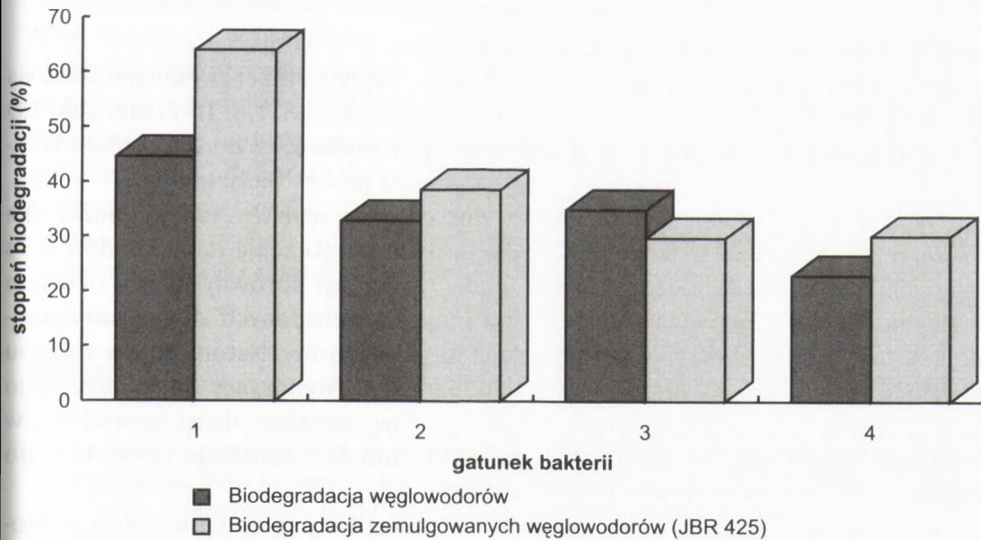
Dodanie do emulgowania układu dodecylosulfonianu sodu (SDS) powodowało wzrost stopnia biodegradacji węglowodorów w obecności bakterii gramujemnych. Największy wzrost obserwowano dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK, dla którego biodegradacja węglowodorów wzrosła o 12,4% w stosunku do układu niezemulgowanego. Natomiast dla szczepu *Pseudomonas putida* obserwowany wzrost wynosił 8,1%. Dodanie SDS-u do układu z bakteriami z rodzaju *Bacillus* powodowało obniżenie stopnia biodegradacji węglowodorów dla obu testowanych szczepów od 2,9 do 7,2%.

Dodanie ramnolipidów do układów zawierających węglowodory powodowało największy wzrost stopnia biodegradacji węglowodorów dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa* TK. Wzrost ten wynosił 19,4%. Dla szczepu *Pseudomonas putida* obserwowano wzrost biodegradacji o 5,6%. Natomiast zróżnicowane oddziaływanie zanotowano dla szczepów z rodzaju *Bacillus*. Dla szczepu *Bacillus subtilis* obserwowano nieznaczne obniżenie stopnia biodegradacji o 5,1%, a w przypadku szczepu *Bacillus licheniformis* biodegradacja zemulgowanych węglowodorów wzrosła o 7,2%. Ramnolipidy, należące do anionowych związków powierzchniowo czynnych, są biosyntezone przez szczep *Pseudomonas aeruginosa*. Dlatego oddziaływanie z tymi bakte-



Rys. 7. Wpływ SDS na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).

riami było szczególnie skuteczne. Obok właściwości emulgujących, wykazują one także bakteriostatyczne działanie w stosunku do niektórych mikroorganizmów, m.in. dla szczepów *Bacillus* (16).



Rys. 8. Wpływ JBR 425 na biodegradację węglowodorów przez czyste szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* Pa TK (1), *Pseudomonas putida* (2), *Bacillus subtilis* (3), *Bacillus licheniformis* (4).

Prowadzono także badania nad wpływem stężenia emulgatorów na skuteczność procesu biodegradacji przy użyciu szczepów *Pseudomonas putida* i *Bacillus subtilis*. Wyniki przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Tabela 1

Wpływ stężenia emulgatorów: AT 7, L-10, Lutensol GD 70, na biodegradację węglowodorów przez szczep *Bacillus subtilis* (7 dni)

Rodzaj emulgatora	Stopień biodegradacji przy stężeniach emulgatorów w stosunku do węglowodorów (%)					
	0	0,04	0,2	0,4	0,8	1,2
AT 7	34,9	25,0	21,8	35,9	48,4	27,3
L-10	34,9	27,0	30,0	24,5	37,4	26,2
Lutensol GD 70	34,9	31,0	36,6	27,3	39,8	24,3

Tabela 2

Wpływ stężenia preparatu JBR 425 na biodegradację węglowodorów przez szczepy *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas putida* (7 dni)

Gatunek bakterii	Stopień biodegradacji przy różnych stężeniach emulgatora w stosunku do węglowodorów (%)					
	0	0,04	0,2	0,4	0,8	1,2
<i>B. subtilis</i>	34,9	19,7	35,1	18,0	29,8	25,2
<i>Ps. putida</i>	32,9	18,0	19,1	20,2	38,5	32,0

Otrzymane wyniki wskazują na zróżnicowany wpływ stężenia emulgatorów na przebieg biodegradacji. Dla przebadanych emulgatorów: AT 7, L-10 i Lutensolu GD 70 stężenie emulgatora 0,8% w stosunku do węglowodorów było optymalne. Wyższe niż optymalne stężenie emulgatora hamowało proces biodegradacji.

Na podstawie analogicznych badań dotyczących wpływu ramnolipidów dla szczepu *Bacillus subtilis* wykazano, że tylko przy użyciu stężenia ramnolipidów 0,2% w stosunku do węglowodorów stopień biodegradacji był porównywalny z układem niezemulgowanym przez ramnolipidy. Dla innych przebadanych stężeń ramnolipidów obserwowano obniżenie biodegradacji węglowodorów. Natomiast dla szczepu *Pseudomonas putida* najwyższy stopień biodegradacji, wynoszący 38,5%, uzyskano przy stężeniu 0,8% w stosunku do węglowodorów, mniejsze ilości ramnolipidów wpływały negatywnie na biodegradację węglowodorów, obniżając ją od 16,0 do 18,3%.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że dodatni wpływ na biodegradację węglowodorów w obecności bakterii gramdodatnich miały przebadane związki powierzchniowo czynne z grupy polioksyetylenowanych alkoholi i alkilopo-

liglikozydów. Zaobserwowano także korzystny wpływ emulgatora AT 7, który jest mieszaniną polioksyetylenowanego alkoholu alifatycznego i polioksyetylenowanego estru kwasu alifatycznego. Natomiast zastosowanie oksyetylenowanych estrów metylowych kwasów kokosowych wpływało negatywnie na przebieg procesu biodegradacji węglowodorów. Negatywne oddziaływanie na skuteczność bakterii gram-dodatnich obserwowano również dla SDS-u.

Anionowe związki powierzchniowo czynne, zarówno syntetyczny (SDS) jak i naturalny (JBR 425) wpływały natomiast korzystnie na biodegradację prowadzoną w obecności bakterii gramujemnych. Dla pozostałych przebadanych emulgatorów nie stwierdzono korzystnego oddziaływania tych związków z bakteriami gramujemnymi. Przyczyną takiego stanu mogą być różnice w budowie powierzchni bakterii gram-dodatnich i gramujemnych. Powierzchnia ta może ulegać zmianom pod wpływem dodawanych związków powierzchniowo czynnych, które mogą modyfikować ścianę komórkową bakterii. Także stężenie związków powierzchniowo czynnych ma istotny wpływ na oddziaływanie bakterii w stosunku do węglowodorów. Dlatego też niezmiernie ważnym elementem jest dobór odpowiedniego związku powierzchniowo czynnego, a także użycie go w odpowiedniej ilości.

4. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, że szczepy bakteryjne z różną szybkością rozkładają węglowodory w zależności od użytego emulgatora. U przebadanych bakterii gram-dodatnich obserwuje się korzystny wpływ na biodegradację węglowodorów polioksyetylenowanych alkoholi oraz alkilopoliglikozydów. Natomiast w przypadku testowanych szczepów należących do bakterii gram-ujemnych najskuteczniejsze okazały się anionowe związki powierzchniowo czynne. W związku z tym efektywne zastosowanie emulgatorów w procesach bioremediacji skażonej wody i gruntu powinno być poprzedzone określeniem składu bakteryjnego środowiska i doбором do tego środowiska odpowiedniej mieszaniny emulgatorów naturalnych i syntetycznych o właściwym stężeniu.

Praca finansowana z badań własnych BW 32/003/2003.

Literatura

1. Kieslich K., (1984), *Biotechnology*, Weinheim, Verlag Chemie, vol. 6a.
2. Austin B., Calomiris J. J., Walker J. D., Colwell R. R., (1977), *Appl. Environ. Microbiol.*, 34 (1) 60-68.
3. Kiyohara H., Nago K., Yana K., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 (2), 454-457.
4. Klug M. J., Markovetz A. J., (1971), *Adv. Microbiol. Physiol.*, 5, 1-43.
5. Ratledge C., (1978), Ed. R. J. Watkinson, *Developments in biodegradation of hydrocarbons*, Appl. Sci. Publ., London, 1-46.
6. Walker J. D., Collwell R. R., (1976a), *Appl. Environ. Microbiol.*, 31 (7), 189-197.

7. Walker J. D., Collwell R. R., (1976b), *Appl. Environ. Microbiol.*, 31 (2), 198-207.
8. Atlas R. M., (1981), *Microbiol. Rev.*, 45, 180-209.
9. Bartha R., Atlas R. M., (1977), *Advan. Appl. Microbiol.*, 22, 225-266.
10. Zhang Y., Miller R. M., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3276-3282.
11. Zhang Y., Miller R. M., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2101-2106.
12. Rijnaarts H. H. M., Norde W., Lyklema J., Zehnder A. J. B., (1995), *Colloids and Surfaces B*, 4, 191-197.
13. Zaremba M. L., Borowski J., (1997), *Mikrobiologia lekarska*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
14. Bielicka K., Kaczorek E., Olszanowski A., Voelkel A., (2002), *Polish Journal of Environmental Studies*, 1 (1), 11-16.
15. Cybulski Z., Dziurla E., Kaczorek E., Olszanowski A., (1999), *Environmental Technology for Oil Pollution*, Jurata, 56-60.
16. Itoh A., Honda H., Tomita F., Suzuki T., (1971), *J. Antibiot.*, 24, 855-859.