

Słowa kluczowe: biosurfaktant, bakterie, węglowodory, stymulacja, biodegradacja

Kazimierz GRABAS*, Barbara KOŁWZAN*, Ewa ŚLIWKA**,
Elena KARPENKO***

WPŁYW RAMNOLIPIDU, PRODUKOWANEGO PRZEZ PSEUDOMONAS PS-17, NA BIODEGRADACJĘ SMOŁY POGAZOWEJ

Zanieczyszczenie gleb i wód podziemnych węglowodorami aromatycznymi i heterocyklicznymi na terenach dawnych gazowni jest poważnym problemem środowiskowym i technicznym. W pracy przeanalizowano wpływ ramnolipidów, produkowanych przez *Pseudomonas sp. PS-17* na stymulację procesu biodegradacji smoły pogazowej. Proces przeprowadzono wykorzystując szczepy wyizolowane z gleby skażonej produktami naftowymi. Badania wykazały, że smoła pogazowa stanowi substrat mało podatny na biodegradację. Wprowadzenie ramnolipidów zwiększyło biodostępność składników smoły i umożliwiło inicjację procesu biodegradacji. Stwierdzono, że efektywność stymulacji zależała od stężenia surfaktantu; najlepsze efekty uzyskano stosując stężenie wynoszące 125 mg ramnolipidu na litr podłoża hodowlanego.

1. WSTĘP

Otrzymywanie gazu z węgla w procesie suchej destylacji należało do przedsięwzięć bardzo uciążliwych dla środowiska ze względu na rozprzestrzenianie się w środowisku związków organicznych, w tym węglowodorów aromatycznych, zwłaszcza WWA (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne) i związków lotnych - BTEX (benzen, toluen, etylobenzen, ksyleny) oraz fenolu [1–4]. Związki te charakteryzują się wysoką toksycznością, trwałością i zdolnością do bioakumulacji [5–8]. W środowisku ulegają powolnym przemianom fizycznym, chemicznym i biologicznym. Ze względu na występujące zagrożenia istniała konieczność opracowania metod ich eliminacji z zanieczyszczonych wód i gruntów. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem do tego celu metod biologicznych. Procesy biodegradacyjne są coraz częściej wykorzystywane w technologiach usuwania różnorodnych zanieczyszczeń środowiska. Opierają się one na naturalnych mechanizmach degradacji związków organicznych przez mikroorganizmy zdolne do wykorzystywania węglowodorów w charakterze źródła węgla i energii [9–17]. Właściwy przebieg bioremediacji zachodzi w przypadkach, gdy węglowodory są

przekształcane w substancje bezpieczne - nietoksyczne, najkorzystniej w związki, CO₂ i H₂O [18].

Mikrobiologiczne metody oczyszczania skażonych wód i gruntów są ograniczone niską rozpuszczalnością węglowodorów, która może redukować ich biodostępność dla mikroorganizmów przeprowadzających proces biodegradacji [15–18]. W procesach bioremediacji warstwy wodonośnej zanieczyszczonej związkami WWA podstawową trudność stanowi także przemieszczanie i migracja bakterii. Mają one, bowiem tendencję do adsorpcji na cząstkach fazy stałej warstwy wodonośnej. Biosurfaktant ze względu swoje właściwości powierzchniowo-czynne zmniejsza przyczepność bakterii do ziaren fazy stałej oraz zwiększa rozpuszczalność węglowodorów przyczyniając się do wzrostu ich biodostępności dla mikroorganizmów.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu ramnolipidów otrzymanych w hodowli mikroorganizmów *Pseudomonas sp.* PS-17 na stymulację procesu biodegradacji węglowodorów smoły pogazowej pobranej z instalacji oczyszczania wód podziemnych na terenie byłej gazowni.

2. MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiły:

Smola pogazowa - pobrana z powierzchni wód podziemnych skażonych odpadami pogazowniczymi na terenie starej zamkniętej gazowni, uzyskującej gaz w oparciu o proces suchej destylacji węgla.

Ramnolipidy – biosurfaktanty wyekstrahowane z hodowli *Pseudomonas* P-17.

Mikroorganizmy - proces biodegradacji prowadzono za pomocą mieszanej kultury trzech szczepów bakterii pochodzących z kolekcji Zakładu Biologii i Ekologii PWr: *Acinetobacter calcoaceticus* H29, *Rhodococcus erythropolis* H45 i *Brevibacterium brevis* B1. Bakterie wyizolowano z gleby skażonej produktami naftowymi.

Isolacja i otrzymywanie biosurfaktantów

Do hodowli i produkcji biosurfaktantów zastosowano szczep bakterii z rodzaju *Pseudomonas* - PS17. Bakterie hodowano na podłożu mineralnym o pH=7,0, źródło węgla stanowił glicerol w ilości 30 g/dm³ [19]. Hodowla prowadzona była w kolbach o poj. 250 cm³, zawierających 50 cm³ podłoża. Inkubacja hodowli, umieszczonej na wytrząsarce rotacyjnej (140 rpm), trwała 96-144 godzin w temp. 30°C. Po zakończeniu hodowli komórki oddzielano poprzez wirowanie. Supernatant zakwaszono wodnym roztworem HCl do pH=2,0 i ekstrahowano octanem etylu. Rozpuszczalnik odparowywano, a pozostały osad rozdzielano metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym (Silica gel No. 5745. E. Merck AG. Darmstadt. Germany) używając mieszaniny chloroformu, metanolu, acetonu i kwasu octowego w stosunku 90:10:6:1 (v/v).

Analiza smoły pogazowej i produktów biodegradacji

Skład jakościowy smoły pogazowej analizowano przy użyciu GC/MS. Analizę wykonano na aparacie Hewlett-Packard ser.II GC 5890, MS 5971, wyposażonym w kolumnę kapilarną, w warunkach programowania temperatury w zakresie 40–250°C. Zarejestrowano chromatogramy: TIC i wybranych jonów fragmentacyjnych.

Smołę pogazową i ekstrakty uzyskane w procesie biodegradacji analizowano poprzez oznaczenie składu grupowego na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym. Określono zawartości frakcji węglowodorów alifatycznych, węglowodorów aromatycznych i związków polarnych. Ponadto, w próbce smoły pogazowej oznaczono zawartość asfaltenów. Z uwagi na stosunkowo małą zawartość asfaltenów w wyjściowej próbce, nie oznaczano ich w produktach pobiodegradacyjnych.

Ocena postępu biodegradacji

Hodowlę mikroorganizmów prowadzono w kolbach Erlenmayera o poj.100 cm³ zawierających 30 cm³ podłoża mineralnego Siskinej-Trocenka (KH₂PO₄ - 1,56g, Na₂HPO₄ - 2,13g, (NH₄)₂SO₄ - 0,5g, MgSO₄·x 7H₂O - 0,2g, CaCl₂ x 2H₂O - 0,02g, woda redest. 1000 cm³, mikroelementy) oraz smołę w stężeniu 0,1% mas. W hodowlach stymulowanych surfaktantem stężenie ramnolipidu wynosiło od 15,6 do 500 mg/dm³ hodowli. Mikroorganizmy wprowadzono do podłoża w postaci zawiesiny w buforze fosforanowym. Hodowle inkubowano w temperaturze 20±2°C przez 14 dni z wytrząsaniem 140 rpm. Po tym czasie ekstrahowano pozostałość smoły z hodowli i oznaczano procent jej ubytku w procesie biodegradacji.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyjściowa smoła pogazowa i uzyskane próbki ekstraktów to niejednorodne substancje, które pod względem chemicznym stanowią mieszaniny węglowodorów alifatycznych i aromatycznych oraz związków polarnych (żywice). W próbkach obecne są również związki wyżej cząsteczkowe - asfalteny. Ich zawartość w smole wyjściowej jest jednak stosunkowo mała (4,4% mas.).

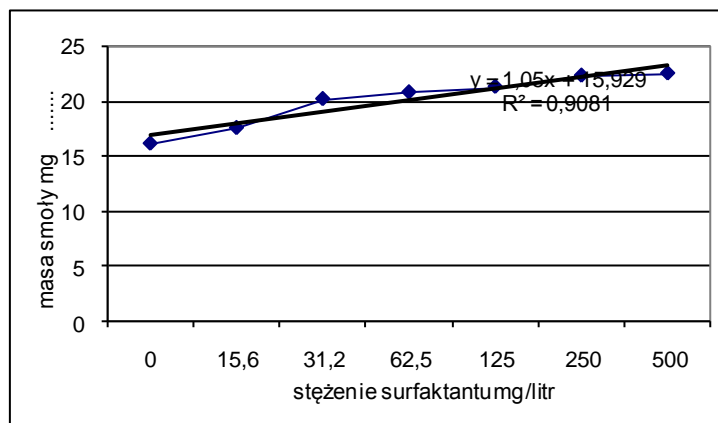
Na podstawie analizy GC-MS próbki smoły stwierdzono, że jest ona mieszaniną związków o zróżnicowanej masie cząsteczkowej (w zakresie C₉–C₂₇). Jako dominujące indywidua chemiczne występują węglowodory alifatyczne:

- n-alkany (najwięcej jest n-pentadekanu),
- n-alkeny (najwięcej jest n-tetradekenu),
- nienasycone węglowodory izoparafinowe.

W smole obecne są węglowodory aromatyczne: n-alkilobenzeny oraz WWA (najwięcej jest metylonaftalenów, kadalenu, fenantrenu, antracenu, fluorenu, acenftenu, naftalenu, fluorantenu). Węglowodory aromatyczne występują jako główny składnik grupowy smoły pogazowej. Wśród związków heterocyklicznych wykryto przede wszystkim związki zawierające tlen: dibenzofuran i metylobenzofuran.

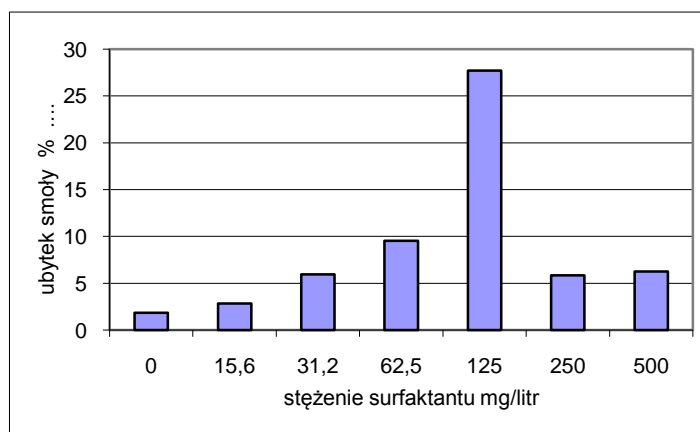
Z uwagi na obecność takich składników jak WWA i związki heterocykliczne smoła pogazowa należy do mieszanin trudnobiodegradowalnych.

Ocena procesu biodegradacji tak skomplikowanej mieszaniny, zwłaszcza w obecności surfaktantów, musi uwzględniać wiele czynników, które mają wpływ na uzyskiwane wyniki analityczne.



Rys. 1. Wpływ ramnolipidu na wydajność ekstrakcji smoly pogazowej

Analiza wydajności ekstrakcji smoly z hodowli przed wprowadzeniem bakterii wykazała, że obecność surfaktantu ma istotny wpływ na masę ekstrahowanej smoly (rys. 1.), dlatego też wszystkie analizy ilościowe uwzględniają kontrolę prowadzoną dla każdego stężenia surfaktantu bez dodatku bakterii.

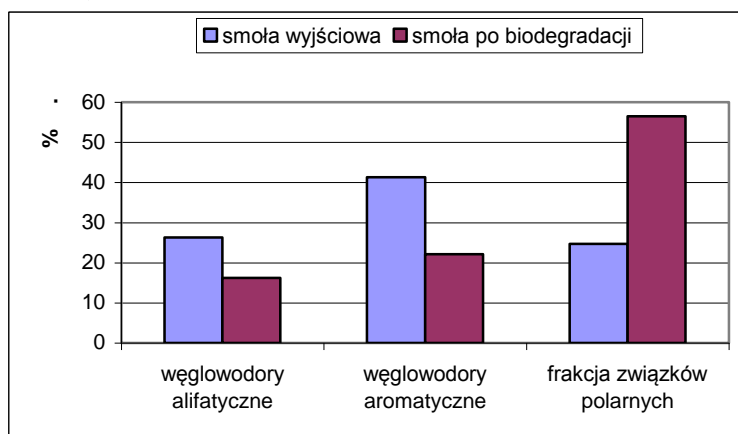


Rys. 2. Wpływ ramnolipidu na biodegradację smoly pogazowej

Biorąc pod uwagę ilość uzyskanych produktów biodegradacji (wyrażoną całkowitą ilością substancji organicznych – ekstrahowanych dichlorometanem) smoła pogazowa

okazała się słabo podatna na rozkład mikrobiologiczny. Mimo, że do biodegradacji użyto szczepów degradujących węglowodory, bez dodatku surfaktantu nie uzyskano rezultatów świadczących o biologicznym rozkładzie smoły. Wprowadzenie ramnolipidu spowodowało inicjację procesu biodegradacji, jednakże ubytek substratu w obecności niskich stężeń ramnolipidu nie był znaczący. Potwierdzenie stymulacji procesu biodegradacji uzyskano dopiero po wprowadzeniu do hodowli ramnolipidu w stężeniu 125 mg/dm³. Ubytek smoły pogazowej wynosił w tym przypadku 27,7% mas po 14 dniowej inkubacji (rys. 2).

Analiza składu grupowego (rys. 3.) wykazała, że udział węglowodorów alifatycznych i aromatycznych w produktach biodegradacji, w obecności optymalnej ilości biosurfaktantu, jest mniejszy niż w wyjściowej próbce smoły (odpowiednio 38,35 i 67,6% mas.).



Rys. 3. Skład grupowy smoły przed i po biodegradacji w obecności biosurfaktantu

5. WNIOSKI

- Smoła pogazowa należy do mieszanin słabo podatnych na rozkład mikrobiologiczny.
- Ocena ilościowa procesu biodegradacji tak skomplikowanej mieszaniny, zwłaszcza w obecności surfaktantów, musi uwzględniać ich wpływ na masę ekstrahowanej smoły.
- Wprowadzenie ramnolipidu spowodowało stymulację procesu biodegradacji smoły pogazowej. Efektywność procesu biodegradacji zależała od stężenia ramnolipidu.

LITERATURA

- [1] Landmeyer J.E., Chapelle F.H., Petkewich M.D., Bradley P.M., Assessment of natural attenuation of aromatic hydrocarbons in groundwater near a former manufactured-gas plant, South Carolina, USA, Environ. Geology, 1998, 34(4), 279-292.
- [2] Bojakowska I., Irmiński W., Zanieczyszczenie związkami organicznymi gleb na terenie starych gazowni, Przegl. Geol., 2002, vol. 50, nr 8, 691-698.
- [3] Haeseler F., Blanchet D., Druelle V., Werner P., Vandecasteele J-P., Analytical characterization of contaminated soils from manufactured gas plants, Environ. Sci. Technol., 1999, 33(6), 825-830.

- [4] Siebilska I., Szymański K., Zanieczyszczenie gruntu wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA) na terenie byłej gazowni, Materiały VII Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej, „Kompleksowe i szczegółowe problemy inżynierii środowiska, Ustronie Morskie 2003.
- [5] Sapota A., Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (substancje smołowe rozpuszczalne w cykloheksanie), Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 2002, 18, 2(32), 179-208.
- [6] Haeseler F., Blanchet D., Druelle V., Werner P., Vandecasteele J.-P., Ecotoxicological Assessment of soils of former manufactured gas plant sites: Bioremediation potential and pollutant mobility. Environ. Sci. Technol., 1999, 33(24), 4379-4384.
- [7] Murarka, I., Neuhauser, E., Sherman, M., Taylor, B.B., Mauro, D.M., Ripp, J., Taylor, T., Organic substances in the subsurface: Delineation, migration, and remediation, J. Hazard. Mater., 1992, vol. 32, no. 2-3, 245-261.
- [8] Mulvey P., The nature of bonding to black carbon – a re-evaluation of risk of MGPs, Gasworks Europe, Redevelopment, site management and contaminant issues of former MGP's and other tar oil polluted sites, MGP 2008 Conference in Dresden, Germany, 2008, 81-97.
- [9] Ghoshal S., Ramaswami A., Luthy R.G., Biodegradation of a phthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems, Environ. Sci. Technol., 1996, 30(4), 1282-1291.
- [10] Althoff K., Mundt M., i in., Microcosms-experiments to assess the potential for natural attenuation of contaminated groundwater, Water Research, 2001, vol. 35, 720-728.
- [11] Durant N.D., Wilson L.P., Bouwer E.J., Microcosm studies of subsurface PAH-degrading bacteria from a former manufactured gas plant, J. of Contaminant Hydrology, 1995, 17, 213-237.
- [12] Blanchet D., Haeseler F., Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons under aerobic conditions: capacities of microflora and limited accessibility, Gasworks Europe, Redevelopment, site management and contaminant issues of former MGP's and other tar oil polluted sites, MGP 2008 Conference in Dresden, Germany, 2008, 75-79.
- [13] Fetzner S., Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions, Appl Microbiol Biotechnol., 1998, 49, 237-250.
- [14] Pak-Hing Lee P.H., Say Kee Ong, Golchin J., and G. L., Nelson G.L., Use of solvents to enhance PAH biodegradation of coal tar-, Water Research, 2001, vol. 35, 3941-3949.
- [15] Klimiuk E., Łebkowska M., Biotechnologia w ochronie środowiska, PWN, Warszawa 2003.
- [16] Kołwzan B., Biodegradacja produktów naftowych, W: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie pod red. J. Surygaly, Ofic. Wyd. PWr., Wrocław 2000, 207-237.
- [17] Kołwzan B., Wykorzystanie mikroorganizmów do oczyszczania gruntów skażonych produktami naftowymi, Inż. Ekolog. 7, 2002, 36-44.
- [18] Kot-Wasik A., Dąbrowska D., Namieśnik J., Degradacja związków organicznych w środowisku, Chem. Inż. Ekol. 2001, 700-722.
- [19] Shulga A., Karpenko E.V., Elyseev S.A., Vildanova-Martishin R.I., Streine *Pseudomonas sp.* PS-17 – producer of extracellular biosurfactant and biopolymer, Ukr. Pat. 10467A, 1996.

INFLUENCE OF RAMNOLIPIDE FROM *PSEUDOMONAS* PS-17 ON GASWORKS BIODEGRADATION

Soil and water pollution by aromatic and heterocyclic hydrocarbons on the gas-works former area are main environmental and technical problem. This report demonstrates the role of ramnolipides isolated from *Pseudomonas sp.* PS-17 in biodegradation process of coal tar stimulation. Biodegradation of aromatic and heterocyclic hydrocarbons were performed by bacterial species isolated from soil contaminated by petroleum products. The study demonstrated low susceptibility of coal tar components for biodegradation. Addition of ramnolipids to soil sample initiated of biodegradation process by increasing bioavailability of heterocyclic and aromatic components of coal tar. It was observed that level of biodegradation process stimulation depended on concentration of used surfactant. The best results of bioremediation process stimulation were obtained for addition 125 mg of ramnolipid to 1 liter of cultivation medium.