

Politechnika Wrocławska  
Wydział Inżynierii Środowiska

Joanna Witek

„Wpływ ramnolipidu otrzymanego z *Pseudomonas  
aeruginosa* BI na biodegradację produktów  
naftowych w układach rozproszonych”

Praca doktorska napisana pod kierunkiem  
Prof. nadzw. dr hab. Barbary Kołwzan

Wrocław 2011

Pani prof. dr hab. Barbarze Kołwzan za cenne wskazówki  
i ogromną życzliwość,  
dr inż. Annie Witek-Krowiak za wszelką pomoc,  
Rodzinie, a w szczególności Mężowi za mobilizację,  
wsparcie, wyrozumiałość, cierpliwość,

serdecznie dziękuje

Joanna Witek

## Spis treści

1.	WSTĘP .....	5
2.	STUDIA LITERATUROWE.....	7
2.1.	CHARAKTERYSTYKA PRODUKTÓW NAFTOWYCH.....	7
2.1.1.	PRZYCZYNY ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA PRODUKTAMI NAFTOWYMI ....	11
2.1.2.	WPLYW ZANIECZYSZCZEŃ NAFTOWYCH NA ŚRODOWISKO .....	12
2.2.	BIODEGRADACJA PRODUKTÓW NAFTOWYCH .....	16
2.2.1.	WPLYW CZYNNIKÓW FIZYCZNO-CHEMICZNYCH I BIOLOGICZNYCH NA SZYBKOŚĆ PROCESU BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH .....	18
2.2.2.	TLENOWY I BEZTLENOWY ROZKŁAD WĘGLOWODORÓW .....	19
2.2.3.	SPOSOBY ZWIĘKSZENIA SKUTECZNOŚCI PROCESU BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH.....	20
2.3.	BIOSURFAKTANTY .....	21
2.3.1.	BUDOWA CHEMICZNA .....	22
2.3.2.	PODZIAŁ BIOSURFAKTANTÓW .....	22
2.3.3.	WŁAŚCIWOŚCI.....	23
2.3.4.	OTRZYMYWANIE .....	27
2.3.5.	ZASTOSOWANIA .....	29
2.4.	RAMNOLIPIDY.....	32
2.4.1.	BIOSYNTeza .....	33
2.4.2.	WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIA.....	35
2.4.3.	METODY IDENTYFIKACJI RAMNOLIPIDÓW .....	35
2.4.4.	METODY IZOLACJI I OCZYSZCZANIA RAMNOLIPIDÓW .....	39
2.5.	SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW Z ZASTOSOWANIEM TECHNIK MEMBRANOWYCH	43
2.6.	ROLA SURFAKTANTÓW W BIODEGRADACJI .....	47
3.	CEL I ZAKRES PRACY.....	55
4.	MATERIAŁY .....	56
4.1.	PODŁOŻA MIKROBIOLOGICZNE.....	56
4.2.	BARWNIKI .....	60
4.3.	ODCZYNNIKI .....	60
4.4.	INNE .....	62
4.5.	ROPA NAFTOWA I JEJ FRAKCJE.....	62

4.6.	BAKTERIE.....	63
5.	METODYKA BADAŃ.....	64
5.1.	SPOSÓB OZNACZANIA PRZYNALEŻNOŚCI TAKSONOMICZNEJ BAKTERII <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> BI.....	64
5.1.1.	BARWIENIE METODĄ GRAMA .....	64
5.1.2.	OCENA RUCHLIWOŚCI BAKTERII NA PODŁOŻU PÓŁPŁYNNYM Z TTC .....	64
5.1.3.	MIKROSKOPOWA OCENA RUCHLIWOŚCI BAKTERII W KROPLI WISZĄCEJ.....	65
5.1.4.	WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI KATALAZOWEJ .....	65
5.1.5.	WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI OKSYDAZOWEJ .....	66
5.1.6.	WYKRYWANIE KWASU Z GLUKOZY .....	66
5.1.7.	TEST O – F .....	66
5.2.	OZNACZANIE ZDOLNOŚCI BAKTERII <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> DO WYTWARZANIA BIOSURFAKTANTÓW .....	67
5.2.1.	WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI HEMOLITYCZNEJ .....	67
5.2.2.	METODA „DROP-COLLAPSE” .....	67
5.2.3.	METODA „OIL-SPREADING” .....	67
5.2.4.	POMIAR NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO.....	68
5.3.	METODYKA OTRZYMYWANIA RAMNOLIPIDÓW.....	68
5.3.1.	METODYKA OZNACZANIA BIOMASY.....	69
5.3.2.	METODYKA OZNACZANIA STĘŻENIA RAMNOLIPIDU .....	69
5.4.	METODYKA ODDZIELANIA BAKTERII OD PODŁOŻA POHODOWLANEGO .....	70
5.4.1.	SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE JEDNOKIERUNKOWYM .....	70
5.4.2.	SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE KRZYŻOWO-PRĄDOWYM.....	71
5.5.	METODYKA PRZYGOTOWANIA I REGENERACJI MEMBRAN .....	72
5.6.	METODYKA IZOLACJI RAMNOLIPIDÓW .....	72
5.7.	METODYKA OCZYSZCZANIA RAMNOLIPIDÓW .....	73
5.7.1.	ETAP I – ZATRZYMANIE PRZEZ MEMBRANĘ RAMNOLIPIDU I BIAŁEK .....	73
5.7.2.	ETAP II – ROZCIEŃCZENIE RETENTATU ALKOHOLEM I ZATRZYMANIE PRZEZ MEMBRANĘ BIAŁEK .....	73
5.8.	ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA LC-MS SKŁADU OTRZYMANEGO BIOSURFAKTANTU .....	74
5.9.	BADANIA BIOLOGICZNYCH WŁAŚCIWOŚCI RAMNOLIPIDU.....	74

5.10.	METODYKA BADAŃ NAD STYMULACJĄ BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH.....	75
5.11.	ANALIZA PRZEBIEGU PROCESU BIODEGRADACJI.....	75
5.12.	METODYKA OKREŚLANIA LICZBY I WIELKOŚCI KROPEL CIĘŻKIEJ FRAKCJI DESTYLACYJNEJ ROPY NAFTOWEJ .....	76
5.13.	PRZEBIEG PROCESU EKSTRAKCJI POZOSTAŁYCH PO BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH.....	76
5.14.	ANALIZA ILOŚCIOWA WĘGLOWODORÓW .....	76
5.15.	ANALIZA GC-MS .....	76
6.	OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ .....	78
6.1.	CHARAKTERYSTYKA SZCZEPU PRODUKUJĄCEGO RAMNOLIPIDY .....	78
6.2.	ANALIZA ZDOLNOŚCI SZCZEPU <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> DO WYTWARZANIA BIOSURFAKTANTÓW .....	79
6.3.	PRODUKCJA BIOSURFAKTANTÓW .....	80
6.4.	ODDZIelenIE BAKTERII OD PODŁOŻA POHODOWLANEGO.....	84
6.4.1.	SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE JEDNOKIERUNKOWYM .....	85
6.4.2.	SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE KRZYŻOWO-PRĄDOWYM.....	87
6.5.	OCZYSZCZANIE RAMNOLIPIDU .....	93
6.5.1.	ULTRAFILTRACJA – ETAP I.....	94
6.5.2.	ULTRAFILTRACJA – ETAP II.....	98
6.6.	WŁAŚCIWOŚCI OTRZYMANEGO RAMNOLIPIDU .....	102
6.7.	WPLYW RAMNOLIPIDU NA STYMULACJĘ BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH.....	104
6.7.1.	WPLYW STĘŻENIA RAMNOLIPIDU.....	105
6.7.2.	WPLYW STĘŻENIA I RODZAJU SUBSTRATU NA STYMULACJĘ PROCESU DEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH.....	107
6.7.2.1.	BIODEGRADACJA FRAKCJI CIĘŻKIEJ.....	108
6.7.2.2.	BIODEGRADACJA FRAKCJI OLEJOWEJ .....	110
6.7.3.	WPLYW TEMPERATURY .....	111
6.7.4.	WPLYW NATLENIANIA .....	112
6.7.5.	WPLYW RODZAJU MIKROORGANIZMÓW.....	114
6.7.6.	WPLYW PH .....	115

6.8.	ANALIZA SZYBKOŚCI PROCESU BIODEGRADACJI.....	116
6.9.	ANALIZA GC-MS POZOSTAŁOŚCI PO BIODEGRADACJI FRAKCJI DESTYLACYJNYCH ROPY NAFTOWEJ .....	120
7.	DYSKUSJA WYNIKÓW.....	123
8.	WNIOSKI.....	129
9.	LITERATURA .....	131

## 1. WSTĘP

Systematyczny wzrost zużycia produktów naftowych (w 2007 roku zużyto 85220 mln ton produktów naftowych czyli o 1,2% więcej niż w roku 2006 [1]) stwarza większe zagrożenie przedostawania się ich do środowiska podczas produkcji, przetwarzania, transportu czy też magazynowania. Obecność produktów naftowych w środowisku stanowi bezpośrednie zagrożenie dla żywych organizmów. Produkty naftowe ujemnie wpływają na produkcję roślinną, pogarszają jakość wód podziemnych stwarzając możliwość zatrucia ludzi i zwierząt, niszczą życie biologiczne w glebie na skutek odcięcia dopływu powietrza i wody [2]. Dlatego też konieczne jest usuwanie zanieczyszczeń naftowych ze środowiska gruntowo-wodnego poprzez zastosowanie szeregu metod fizycznych, chemicznych lub biologicznych. Spośród wymienionych największą popularnością cieszą się metody biologiczne, przede wszystkim ze względu na to, iż są bardziej przyjazne środowisku oraz wymagają mniejszych nakładów finansowych. Coraz częściej do oczyszczania gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi stosuje się biodegradację, która zachodzi przy udziale mikroorganizmów zdolnych do wykorzystywania węglowodorów w charakterze źródła węgla i energii. Proces ten przebiega efektywnie tylko wtedy, gdy substrat jest biodostępny dla drobnoustrojów. W przypadku produktów naftowych biodostępność ograniczona jest ich małą rozpuszczalnością w wodzie, co powoduje ograniczenie wzrostu mikroorganizmów i spowalnia tempo procesu biodegradacji. W ostatnich latach poświęca się wiele uwagi możliwości stymulowania biodegradacji za pomocą związków powierzchniowo czynnych pochodzenia syntetycznego, a także coraz częściej naturalnego. Ma to przede wszystkim na celu skrócenie czasu oraz zwiększenie stopnia biodegradacji produktów naftowych poprzez zwiększenie biodostępności związków hydrofobowych dla rozkładających je mikroorganizmów.

Zastosowanie surfaktantów i biosurfaktantów w procesie biodegradacji związków hydrofobowych było przedmiotem wielu badań naukowych. Wyniki tych analiz wskazują na większą atrakcyjność biosurfaktantów. W porównaniu z surfaktantami syntetycznymi biosurfaktanty charakteryzują się mniejszą toksycznością, większą biodegradowalnością oraz większą efektywnością działania w szerokim zakresie temperatur, pH czy zasolenia. Wciąż nie ma jednoznacznej

odpowiedzi czy stosowanie biosurfaktantów wpływa korzystnie na proces biodegradacji produktów naftowych. W literaturze można znaleźć doniesienia o pozytywnym, negatywnym jak i obojętnym oddziaływaniu biosurfaktantów na ten proces. Przyczyną tak rozbieżnych informacji są oddziaływania jakie zachodzą pomiędzy mikroorganizmami, biosurfaktantami i rozkładanymi węglowodorami, dlatego każdy przypadek należy rozpatrywać oddzielnie i nie można wysnuć jednego generalnego wniosku, że biosurfaktanty stymulują lub hamują biodegradację substancji hydrofobowych, nawet wtedy gdy badania dotyczą tylko jednego biosurfaktantu. Dzieje się tak dlatego, że mikroorganizmy w różny sposób pobierają węglowodory i biosurfaktant może ułatwiać lub utrudniać ten proces.

Pomimo dużego zainteresowania biosurfaktantami i ich potencjalnymi zastosowaniami w wielu gałęziach przemysłu jak i w ochronie środowiska, związki te nadal nie są komercyjnie produkowane i zakup ich stanowi poważny problem. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest nieekonomiczny proces produkcji tych substancji, spowodowany głównie trudnościami w izolacji ich z podłoża pohodowlanego i oczyszczaniu.



## 2. STUDIA LITERATUROWE

### 2.1. CHARAKTERYSTYKA PRODUKTÓW NAFTOWYCH

Produkty naftowe to mieszanina różnych związków, głównie węglowodorów: parafin, naftenów, arenów oraz olefin.

Nafteny (cykloalkany lub cykloparafiny) to grupa węglowodorów występująca w największych ilościach (średnio 50% m/m) w ropie naftowej i produktach pochodzących z jej przerobu. Są to nasycone węglowodory pierścieniowe, zawierające najczęściej pięcio- lub sześcioczłonowe pierścienie z bocznym łańcuchem o różnej długości. Największy udział mają metylocyklopentan oraz metylocykloheksan, nawet do 2% m/m ropy. W porównaniu z parafinami, cykloparafiny mają mniejszą lotność i większą gęstość [2].

Parafiny (alkany) to druga po naftenach grupa węglowodorów występująca w ropie naftowej i produktach naftowych w dużych ilościach. Są to nasycone węglowodory łańcuchowe o ogólnym wzorze  $C_nH_{2n+2}$ . Parafiny mogą posiadać łańcuch prosty (n-parafiny lub n-alkany) lub rozgałęziony (izo-parafiny lub izo-alkany). Rozgałęzienie łańcucha powoduje obniżenie temperatury wrzenia, tak więc izo-parafiny mają niższe temperatury wrzenia niż ich odpowiedniki n-parafinowe [3].

Areny to węglowodory aromatyczne, czyli węglowodory pierścieniowe, w których występują zdelokalizowane orbitale molekularne, obejmujące cały pierścień. Areny dzielą się na jednopierścieniowe (BTEX-y<sup>1</sup>) zawierające jeden pierścień benzenowy oraz wielopierścieniowe (WWA<sup>2</sup>) zawierające min 2 skondensowane pierścienie benzenowe. Surowa ropa naftowa zawiera do 15% m/m arenów, natomiast oleje smarowe mogą posiadać nawet powyżej 50% m/m tych węglowodorów. Największy udział mają toluen i m-ksylen. Jednopierścieniowe węglowodory aromatyczne są niebezpieczne dla środowiska ze względu na toksyczność, kancerogenność i dobrą rozpuszczalność w wodzie.

---

<sup>1</sup> BTEX – grupa jednopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, której nazwa jest skrótem od pierwszych liter: benzen, toluen, etylobenzen, ksylen

<sup>2</sup> WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

Olefiny (alkeny) to nienasycone węglowodory posiadające jedno lub więcej podwójnych wiązań pomiędzy atomami węgla. Mogą mieć budowę łańcuchową lub pierścieniową. W surowej ropie naftowej nie występują, natomiast obecne są w produktach naftowych.

Produkty naftowe można podzielić na:

- paliwa płynne:
  - ✓ gaz płynny,
  - ✓ benzyna silnikowa,
  - ✓ paliwa lotnicze,
  - ✓ oleje napędowe,
  - ✓ oleje opałowe,
- produkty niepaliwowe:
  - ✓ środki smarowe,
  - ✓ woski naftowe,
  - ✓ asfalty,
  - ✓ koks naftowy,
  - ✓ surowce petrochemiczne,
  - ✓ inne [4].

Paliwa otrzymywane z ropy znajdują szerokie zastosowanie, a gospodarka będzie jeszcze długo uzależniona od ich stosowania. Szczególnie jest to widoczne w dynamicznym rozwoju przemysłu rafineryjnego [5].

Paliwowe produkty naftowe są substancjami praktycznie nierozpuszczalnymi w wodzie. Działają szkodliwie na organizmy wodne, dlatego przedostanie się ich dużych ilości do wód może stwarzać zagrożenie dla organizmów wodnych, jak również może powodować długo utrzymujące się niekorzystne zmiany w środowisku wodnym. Olej napędowy jest substancją o potencjalnym działaniu rakotwórczym. Benzyna natomiast jest substancją rakotwórczą, mutagenną, szkodliwą i drażniącą. Olej napędowy jest lżejszy od wody, w wyniku czego gromadzi się na jej powierzchni skąd częściowo odparowuje. Benzyna również jest lżejsza od wody, ale charakteryzuje się też dużą lotnością, w wyniku czego szybko odparowuje i nie kumuluje się w środowisku. Właściwości wybranych produktów naftowych przedstawiono w tabeli 1.

Tab. 1. Właściwości wybranych produktów paliwowych [6, 7, 8, 9].

	<b>Benzyna PKN ORLEN</b>	<b>Olej napędowy PKN ORLEN</b>	<b>Olej opalowy lekki PKN ORLEN</b>	<b>Paliwo lotnicze Grupa LOTOS S.A.</b>
Temperatura krzepnięcia	-	-5 °C gat. B -20 °C gat. D -35 °C gat. F -40 °C arktyczny klasa 1	-20 °C	-
Temperatura początku wrzenia	ok. 30 °C	ok. 180 °C	180 °C	150 °C
Temperatura końca wrzenia	210 °C	ok. 360 °C	360 °C	290 °C
Temperatura zapłonu	-51 °C	min 56 °C	min 56 °C	> 38 °C
Temperatura samozapłonu	340 °C (bezołowiowa 95) 350 °C (bezołowiowa 98)	270 °C	270 °C	> 200 °C
Granice wybuchowości	1,3% obj. - 10,6%obj. (bezołowiowa 95) 1,7% obj. - 10,5% obj. (bezołowiowa 98)	3,11 – ok. 15,0 % obj.	0,7 – 8,0 % obj.	brak danych
Gęstość w temp. 15 °C	0,720 – 0,775 g/cm <sup>3</sup>	820 - 845 kg/m <sup>3</sup> (gatunki B, D i F) 800 - 845 kg/m <sup>3</sup> (klasa 1)	maks. 860 kg/m <sup>3</sup>	0,755-0,840
Prężność par	lato: 45,0 – 60,0 kPa zima: 60,0 – 90,0 kPa	brak danych	-	brak danych

Prężność par w temp. 50 °C	118,6 kPa (bezołowiowa 95) 119,3 kPa (bezołowiowa 98)	-	ok. 2 kPa	brak danych
Lepkość w temp. 40 °C	-	2,00 – 4,50 mm <sup>2</sup> /s (gatunki B, D i F) 1,50 – 4,00 mm <sup>2</sup> /s (klasa 1)	-	brak danych
Gęstość par względem powietrza	ok. 3,8	ok. 6	ok. 6	brak danych
Rozpuszczalność	praktycznie nie rozpuszcza się w wodzie; miesza się z większością rozpuszczalników organicznych	nie rozpuszcza się w wodzie; rozpuszcza się w węglowodorach, alkoholach, eterach, dwusiarczku węgla, czterochlorku węgla, chloroformie.	nie rozpuszcza się w wodzie; rozpuszcza się w węglowodorach, alkoholach, eterach, dwusiarczku węgla, czterochlorku węgla, chloroformie	nie rozpuszcza się w wodzie, rozpuszcza się w większości rozpuszczalników organicznych

### 2.1.1. PRZYCZYNY ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKA PRODUKTAMI NAFTOWYMI

Do środowiska wodnego i gruntowego przedostaje się ok. 0,1-0,25% zużywanej ropy naftowej, z czego większość stanowi surowa ropa naftowa [10]. Spośród produktów naftowych najczęściej uwalnianie do środowiska są paliwa (ich produkcja stanowi 80-83% przetwarzanej ropy) [11].

Na skażenie produktami naftowymi narażone są okolice rafinerii ropy naftowej, baz magazynowych ropy i produktów naftowych, stacji benzynowych oraz zakładów przemysłowych. Produkty naftowe stanowią zanieczyszczenie terenów byłych baz wojsk rosyjskich, a także miejsc wypadków z udziałem środków transportu przewożących surową ropę naftową lub produkty pochodzące z jej przetwarzania [12]. W 2007 roku wycieki produktów naftowych podczas transportu (kolejowego, drogowego, rurociągowego, wodnego) stanowiły prawie 30% wszystkich zdarzeń o znamionach poważnej awarii. Największy udział miał transport drogowy – 15% wszystkich zdarzeń. Najpoważniejsze w skutkach są jednak wycieki z rurociągów ropy naftowej i produktów naftowych, które stanowiły ponad 5% wszystkich awarii w 2007 roku. Przyczynami tych zdarzeń były: zły stan techniczny pojazdów, zły stan techniczny dróg, nieprzestrzeganie przepisów ruchu drogowego, próby kradzieży paliw z rurociągów przesyłowych, uszkodzenia wysokociśnieniowych rurociągów przesyłowych gazu w czasie robót ziemnych, korozja rurociągów [13]. Inną przyczyną obecności produktów naftowych w środowisku gruntowo-wodnym są kopalnie ropy naftowej (podczas wiercenia otworów poszukiwawczych i eksploatacyjnych mogą do środowiska przedostawać się ścieki i odpady wiertnicze [14, 15]), pojazdy samochodowe, urządzenia energetyczne, przemysłowe i komunalne zużywające paliwa lub/i inne produkty naftowe, przetwórnice odpadów rafineryjnych i surowców wtórnych oraz urządzenia indywidualnego użytku domowego [10].

Węglowodory zanieczyszczają nie tylko środowisko lądowe, ale również morskie. Przyczyny zanieczyszczenia mórz produktami naftowymi:

- żegluga: przedostawanie się ze statków substancji zanieczyszczających (ropa naftowa, oleje) w wyniku normalnej eksploatacji ( ok. 160-6500 ton rocznie), jak również podczas wypadków czy awarii ( ok. 200-9000 ton rocznie),

- eksploatacja rurociągów podmorskich: przypadkowe przedostanie się produktów naftowych do wód morskich,
- lotnictwo i motoryzacja: przedostawanie się poprzez atmosferę wytwarzanych podczas normalnej eksploatacji spalin do wód morskich,
- wycieki ropy z dna: 0,6 mln ton rocznie.

Najczęstszymi przyczynami wypadków z udziałem statków na Bałtyku są: osadzenie na mieliźnie (41%), kolizje (27%), uszkodzenia maszyn i urządzeń na statkach (11%), przy czym w 39% zdarzeń zawinił czynnik ludzki a w 20% – usterki techniczne. Statki najczęściej uczestniczące w wypadkach to: towarowe (38%), promy (15%), tankowce (13%), kontenerowce (10%) i masowce (10%) [16].

### 2.1.2. WPLYW ZANIECZYSZCZEŃ NAFTOWYCH NA ŚRODOWISKO

Produkty naftowe przedostając się do środowiska gruntowo-wodnego w dużych ilościach stanowią poważne zagrożenie dla wszystkich żywych organizmów. Uwalnianie ich do środowiska powoduje hamowanie wymiany gazowej, ograniczenie dostępu światła i zmniejszenie stężenia rozpuszczonego tlenu [17]. Skutkiem tego są zmiany składu chemicznego roślin, zaprzestanie produkcji tlenu przez rośliny zawierające chlorofil, stopniowe obumieranie roślin, a w konsekwencji znaczny spadek produkcji roślinnej. Obecność zanieczyszczeń naftowych w gruncie powoduje wzrost dostępności węgla organicznego i zmniejszenie dostępności azotu, o który rośliny zaczynają konkurować. Niedostatek azotu powoduje zmniejszenie lub zahamowanie wzrostu roślin. Węglowodory gazowe, których źródłem są produkty naftowe, pod wpływem bakterii ulegają przemianom do wody i dwutlenku węgla. Gromadzenie się w glebie dwutlenku węgla powoduje jej zakwaszenie, co wpływa na uwalnianie się z glinokrzemianów toksycznego glinu. Zakwaszenie gleby wraz z deficytem tlenu powoduje wzrost łatwo przyswajalnych jonów manganu i żelaza, których nadmiar w glebie zaburza metabolizm roślin [18]. Produkty naftowe obecne w gruncie powodują degradację i nieprzydatność użytkową gleby [19], niszczą strukturę koloidalną gleby, zaburzają pierwotne (zwięzłość, plastyczność, lepkość) i wtórne (właściwości wodne, powietrzne i cieplne) właściwości fizyczne gleby, niszczą zdolności sorpcyjne gleby oraz życie biologiczne środowiska gruntowego [20]. Zanieczyszczenie gleby produktami naftowymi wpływa negatywnie na pobieranie przez

rośliny wody i soli mineralnych z podłoża oraz na oddychanie korzeniowe, w wyniku czego korzenie tracą zdolność wytwarzania włókników. W zdegradowanej glebie tworzą się warunki beztlenowe, nasila się denitryfikacja i procesy uwalniające siarkowodor. W wyniku tego powstaje wiele substancji toksycznych dla mikroorganizmów tlenowych, korzeni roślin i fauny glebowej. Obecność zanieczyszczeń naftowych zmienia skład i aktywność mikroflory glebowej ograniczając rozwój niektórych szczepów, zmieniając warunki pokarmowe i energetyczne, pogarszając wodne i tlenowe warunki glebowe. Zanieczyszczenia naftowe obecne w wodach gruntowych w dużych stężeniach stanowią bezpośrednie zagrożenie dla żywych organizmów, zasiedlających skażone środowisko. Toksyczność tych substancji (Tab. 2) wynika zarówno z ich własności fizycznych, jak i chemicznych. Produkty naftowe wpływają negatywnie na jakość wód podziemnych i powierzchniowych. Działają toksycznie na zamieszkującą tam florę i faunę, ujemnie wpływają na właściwości organoleptyczne wody, utrudniają proces jej uzdatniania powodując, że nie nadaje się ona do celów pitnych [21].

Tab. 2. Toksyczność wybranych produktów naftowych [6, 7, 8].

	<b>Toksyczność ostra</b>	<b>Ekotoksyczność</b>
Benzyna PKN ORLEN	LD50 doustne, szczur > 5 000 mg/kg LD50 dermalne, królik > 2 000 mg/kg	- ryby LC50/96 h 8,3 – 27 mg/l - skorupiaki EC50/48 h 4,5 – 32 mg/l - glony IC50/72 h 3,1 – 30 000 mg/l
Olej napędowy PKN ORLEN	LD50 doustne, szczur > 5000 mg/kg LD50 przez skórę, królik > 4100 mg/kg	- ryby LC50/96 h <i>Jordanella floridae</i> 54 mg/l LC50/8 dni <i>Pimephales promelas</i> 31 mg/l TLm/96 h <i>Cyprinodon variegatus</i> 93 mg/l - skorupiaki TLm/48 h <i>Palamonestes pugio</i> 3,4 mg/l - algi EC50/12 dni <i>Focus endatatus</i> 20 mg/l
Olej opałowy lekki PKN ORLEN	Brak danych	-ryby LC50 /96h <i>Jordanella floridae</i> 54 mg/l LC50 /96h <i>Pimephales promelas</i> 35 mg/l

Niektóre składniki produktów naftowych wykazują właściwości toksyczne, mutagenne i kancerogenne [22, 23] wobec wszystkich żywych organizmów. Wśród zanieczyszczeń naftowych szczególnie niebezpieczne dla człowieka są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), które powstają podczas

niecałkowitego spalania produktów naftowych, jak również w procesach przeróbki ropy naftowej. Związki te przedostają się ze środowiska do organizmu człowieka drogą oddechową, pokarmową oraz poprzez skórę, a w wyniku ich metabolizowania powstają związki epoksydowe o charakterze mutagennym i kancerogennym, które mogą być odpowiedzialne za rozwój raka płuc, jelit, wątroby, trzustki lub skóry [24, 25].

O zanieczyszczeniu środowiska produktami naftowymi świadczy ich obecność w ilościach przekraczających dopuszczalne stężenia. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (Dz. U.02.165.1359 z dnia 4 października 2002 r.) w odniesieniu do produktów naftowych reguluje dopuszczalne zawartości węglowodorów: C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> (benzyna), C<sub>12</sub>-C<sub>35</sub> (olej mineralny), węglowodorów aromatycznych oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w glebie (Tab. 3). Odnośnie standardów dotyczących wód podziemnych nie ma uregulowań prawnych. Istnieją jedynie wskazówki metodyczne, opracowane przez Państwową Inspekcję Ochrony Środowiska, dotyczące oceny stopnia zanieczyszczenia środowiska gruntowo-wodnego produktami naftowymi (Tab. 4).



Tab. 3. Dopuszczalne stężenia węglowodorów w glebie [mg/kg] wg rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi. (Dz. U.02.165.1359 z dnia 4 października 2002 r.).

Substancja	Tereny chronione przepisami ustaw	Grunty rolne, leśne, zadrzewione, osiedlowe					Tereny przemysłowe, górnicze, komunikacyjne			
		głębokość [m ppt]								
		0-0,3	0,3-15		>15		0-2	2-15		
			Wodoprzepuszczalność gruntów [m/s]							
		do $1 \times 10^{-7}$	poniżej $1 \times 10^{-7}$	do $1 \times 10^{-7}$	poniżej $1 \times 10^{-7}$		do $1 \times 10^{-7}$	poniżej $1 \times 10^{-7}$		
C <sub>6</sub> -C <sub>12</sub>	1	1	5	375	50	750	500	50	750	
C <sub>12</sub> -C <sub>35</sub>	30	50	200	1000	1000	3000	3000	1000	3000	
węglowodory aromatyczne (WA)										
benzen	0,05d	0,1	0,2	25	3	50	100	3	150	
etylobenzen	0,05d	0,1	1	75	10	150	200	10	250	
toluen	0,05d	0,1	1	75	5	150	200	5	230	
ksylen	0,05d	0,1	1	35	5	75	100	5	150	
styren	0,1	0,1	1	5	2	100	60	2	100	
suma WA	0,1	0,1	1	75	10	150	200	10	250	
wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)										
naftalen	0,1	0,1	5	20	10	40	50	10	40	
fenantren	0,1	0,1	5	20	10	40	50	10	40	
antracen	0,1	0,1	5	20	10	40	50	10	40	
fluoranten	0,1	0,1	5	20	10	40	50	10	40	
chrysen	0,1	0,1	5	20	10	40	50	10	40	
benzo(a) antracen	0,1	0,1	5	20	10	40	50	10	40	
benzo(a) piren	0,02	0,03	5	10	5	40	50	5	40	
benzo(a) fluoranten	0,1	0,1	5	10	5	40	50	5	40	
benzo(ghi) perylen	0,1	0,1	10	10	5	40	50	5	100	
suma WWA	1	1	20	40	20	200	250	20	200	

d – granica wykrywalności, ppt – pod poziomem terenu

Tab. 4. Dopuszczalne stężenia węglowodorów w wodach podziemnych [ $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ ].

<b>Substancja</b>	<b>Tereny chronione przepisami ustaw</b>	<b>Grunty rolne, leśne, zadrzewione, osiedlowe</b>	<b>Tereny przemysłowe, górnicze, komunikacyjne</b>
Benzen	0,2	1	5
Etylobenzen	0,2	20	60
Toluen	0,2	15	50
Ksylen	0,2	20	60
Fenol	0,2	15	50
suma WWA	0,2	30	100
C <sub>6</sub> -C <sub>12</sub>	10	40	150
C <sub>12</sub> -C <sub>35</sub>	50	200	600

## 2.2. BIODEGRADACJA PRODUKTÓW NAFTOWYCH

Produkty naftowe są zanieczyszczeniami o niskiej rozpuszczalności w wodzie [26], a usunięcie ich ze środowiska jest bardzo trudne, kosztowne i często tylko częściowo skuteczne [27]. Do rekultywacji terenów skażonych produktami naftowymi stosuje się metody fizyczne, chemiczne i biologiczne [28]. Metody fizyczne takie jak płukanie gruntu, wentylacja gruntu, desorpcja parą wodną, ekstrakcja rozpuszczalnikiem, odczerpywanie fazy organicznej z powierzchni wód gruntowych czy odpompowywanie zanieczyszczonej wody gruntowej i oddzielanie frakcji olejowej z wykorzystaniem separatora pozwalają jedynie na przeniesienie zanieczyszczenia w inne miejsce. Ponadto stosowanie metod fizycznych do oczyszczania gruntów skażonych produktami naftowymi jest często nieefektywne ze względu na małą rozpuszczalność tych substancji w wodzie oraz z powodu adsorbowania się zanieczyszczeń na cząstkach gleby. W ostatnich latach największym zainteresowaniem cieszą się metody biologiczne, w których główną rolę odgrywają mikroorganizmy zdolne do wykorzystywania węglowodorów w charakterze źródła węgla i energii [29]. Zaletą metod biologicznych jest fakt, że:

- umożliwiają bezpośrednią degradację zanieczyszczeń [30],
- wykorzystują szlaki metaboliczne mikroorganizmów prowadzące do powstania nieszkodliwych produktów końcowych: H<sub>2</sub>O i CO<sub>2</sub>,

- zanieczyszczenia są źródłem energii potrzebnej do ich unieszkodliwienia,
- nie występują skutki uboczne w postaci niszczenia krajobrazu w miejscu ich stosowania,
- koszt oczyszczania jest niższy w porównaniu z innymi metodami.

Wiele bakterii posiada zdolność do rozkładania węglowodorów. Należą one m.in. do takich rodzajów jak *Pseudomonas*, *Bacillus* [31], *Rhodococcus* [32], *Sphingomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Arthobacter*, *Brevibacterium*, *Xanthomonas* i *Mycobacterium* [33]. Tolerują one wysokie stężenia węglowodorów i posiadają wysoką zdolność degradacji. W literaturze szeroko opisano [24, 25, 26, 28, 34, 131, 132, 139, 140, 141, 183, 197] biodegradację pojedynczych alkanów i WWA przez pojedyncze szczepy i mieszane kultury, natomiast na temat biodegradacji mieszanin węglowodorów takich jak ropa naftowa jest mało informacji. Węglowodory alifatyczne łatwo ulegają biodegradacji, podczas gdy rozgałęzione węglowodory łańcuchowe są odporne na atak mikrobiologiczny i mogą akumulować się w środowisku [34]. WWA zawierające mniej niż 3 pierścienie są często wykorzystywane przez mikroorganizmy jako jedyne źródło węgla i energii, podczas gdy mineralizacja WWA zawierających więcej niż 3 pierścienie nie jest tak powszechna, i w niektórych przypadkach jest możliwa tylko w obecności innych substratów (kosubstratów). Łatwiej degradowane przez bakterie są węglowodory w stanie rozpuszczonym w wodzie, podczas gdy degradacja stałych węglowodorów jest trudna przede wszystkim dlatego, że rozproszenie fazy stałej w fazie wodnej wymaga zużycia dużej ilości energii [35]. Powszechnie wiadomo, że jeden gatunek nie jest w stanie całkowicie rozłożyć żadnej ropy naftowej, która jest mieszaniną różnych węglowodorów. W degradację ropy naftowej oraz olejów rafinowanych zaangażowane jest konsorcjum bakterii, z których poszczególne gatunki mogą rozkładać inne węglowodory [36] i wykorzystywać różne szlaki metaboliczne.

### 2.2.1. WPLYW CZYNNIKÓW FIZYCZNO-CHEMICZNYCH I BIOLOGICZNYCH NA SZYBKOŚĆ PROCESU BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH

Podstawowe czynniki wpływające na biodegradację [37] produktów naftowych w skażonym środowisku to:

- stężenie i struktura chemiczna zanieczyszczeń naftowych,
- obecność związków biogennych takich jak azot i fosfor,
- temperatura,
- wilgotność,
- pH,
- dostępność tlenu,
- zawartość substancji organicznych,
- występowanie związków toksycznych,
- skład ilościowy i jakościowy mikroorganizmów,
- aktywność biologiczna mikroorganizmów [38, 39].

Najłatwiej biodegradacji ulegają n-alkany, w następnej kolejności alkany rozgałęzione, węglowodory aromatyczne o małej masie cząsteczkowej i na końcu wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Im dłuższy łańcuch posiada n-alkan tym trudniej ulega on biologicznemu rozkładowi. Również rozgałęzienie łańcucha wpływa na podatność na biodegradację. Węglowodory rozgałęzione są trudniej rozkładane niż te o prostych łańcuchach. Biodegradacja węglowodorów może zachodzić w szerokim zakresie temperatur, aczkolwiek optymalna temperatura dla wzrostu większości drobnoustrojów wynosi 18-30 °C. Odczyn podłoża ma również ogromne znaczenie i najbardziej optymalny powinien mieścić się w zakresie 6-8. Aby proces biodegradacji zachodził sprawnie należy zapewnić bakteriom odpowiednią ilość węgla, azotu i fosforu, gdyż są to pierwiastki niezbędne do produkcji białek przez mikroorganizmy, a więc niezbędne do powstawania nowych komórek. Powszechnie uważa się, że właściwa proporcja węgla do azotu i fosforu to 10:1:0,1. Drobnoustroje do wzrostu i rozmnażania potrzebują również wody i tlenu, dlatego ich odpowiednia ilość pozytywnie wpływa na stopień biodegradacji. Obecność innych niż węglowodory źródeł węgla oraz substancji toksycznych może opóźniać proces biodegradacji.

Drobnoustroje najpierw rozkładają substancje łatwiej biodegradowalne, a dopiero później węglowodory będące składnikami produktów naftowych. Natomiast substancje toksyczne hamują wzrost mikroorganizmów. Postęp procesu biodegradacji uzależniony jest od składu ilościowego i jakościowego mikroorganizmów oraz od ich wyposażenia enzymatycznego.

Biodegradacja jest procesem tanim, ekologicznie bezpiecznym, pozwalającym na obniżenie stężenia zanieczyszczeń naftowych w środowisku. Istnieje jednak wiele czynników, które ograniczają ten proces w środowisku gruntowo-wodnym. Wśród nich można wyróżnić:

- nierozpuszczalność zanieczyszczeń w wodzie,
- adsorpcja na cząstkach gleby,
- mała bioprzyzwajalność dla mikroorganizmów,
- zmniejszenie mobilności mikroorganizmów w środowisku gruntowo-wodnym,
- niska aktywność degradacyjna mikroorganizmów autochtonicznych,
- deficyt substancji biogennych (N, P),
- niska temperatura,
- podwyższone zasolenie [40, 41].

### 2.2.2. TLENOWY I BEZTLENOWY ROZKŁAD WĘGLOWODORÓW

Węglowodory są degradowane przez drobnoustroje zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. W przypadku mikroorganizmów tlenowych pierwszymi enzymami biorącymi udział w rozkładzie n-alkanów są monooksygenazy, podczas gdy węglowodory aromatyczne atakowane są przez dioksygenazy. Rozgałęzione węglowodory aromatyczne degradowane są poprzez atak na pierścień aromatyczny przy pomocy dioksygenaz lub na część łańcuchową przy pomocy monooksygenaz albo poprzez jednoczesny atak na obie grupy [42]. Enzymy te włączają grupy hydroksylowe pochodzące od tlenu cząsteczkowego do łańcucha alifatycznego lub do pierścienia aromatycznego. Alkohole powstałe z węglowodorów alifatycznych są dalej utleniane do odpowiednich kwasów, a związki fenolowe powstające w wyniku hydroksylowania pierścieni aromatycznych są bezpośrednio prekursorami do tlenowego rozkładu pierścieni [43, 44]. Alkany cykliczne z rozgałęzionymi podstawnikami rozkładane są

przy użyciu monooksygenaz [45, 46], a w wyniku ich biologicznego utleniania powstają kwasy dikarboksylowe, które dalej są metabolizowane w komórkach mikroorganizmów zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Beztlenowy rozkład n-alkanów przebiega według dwóch mechanizmów. Pierwszy z nich polega na aktywacji terminalnego atomu węgla w cząsteczce n-alkanu i przyłączeniu do cząsteczki fumaranu. Drugi polega na karboksylacji przy atomie C<sub>3</sub>. Oba te mechanizmy zaobserwowano również w beztlenowym rozkładzie węglowodorów aromatycznych. Natomiast n-alkeny mogą być rozkładane zarówno przez utlenianie podwójnego wiązania przy atomie C<sub>1</sub>, jak również przez przyłączenie jednostki bądź jednostek węglowych do atomów C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> i do terminalnego atomu węgla na nasyconym końcu cząsteczki. Utlenianie podwójnego wiązania prowadzi najpierw do powstania alkoholu pierwszorzędowego, a następnie do liniowego kwasu tłuszczowego [47], podczas gdy przyłączanie węgla organicznego prowadzi do powstania metylo-, etylo- rozgałęzionych kwasów tłuszczowych [48].

### 2.2.3. SPOSOBY ZWIĘKSZENIA SKUTECZNOŚCI PROCESU BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH

Biodegradacja prowadzona w warunkach naturalnych jest procesem powolnym. Dlatego w celu uzyskania większego stopnia degradacji stosuje się szereg zabiegów wspomagających. Jedną z metod wspomagających biodegradację jest stosowanie pożywek. Obecność w środowisku gruntowo-wodnym dużych ilości zanieczyszczeń naftowych powoduje zachwianie naturalnych proporcji substancji biogennych w wyniku wzrostu ilości węgla w stosunku do zawartości azotu i fosforu. Niedostateczna ilość azotu i fosforu przy dużej zawartości węgla spowalnia naturalny przebieg biodegradacji produktów naftowych. W celu zwiększenia skuteczności tego procesu uzupełnia się niedobory azotu i fosforu poprzez wprowadzanie do środowiska gruntowo-wodnego preparatów o odpowiednio dobranym składzie. Preparaty w postaci ciekłej lub stałej wprowadza się w różny sposób w zależności od głębokości występowania skażenia. Większość procesów biodegradacji produktów naftowych zachodzi w warunkach tlenowych, dlatego szybkość i wydajność biodegradacji zależy od odpowiedniej zawartości tlenu w powietrzu gruntowym. Wzbogacenie środowiska gruntowo-wodnego w tlen można osiągnąć poprzez wprowadzanie preparatów

chemicznych (np. nadtlenuków), które w czasie powolnego rozkładu, uwalniają tlen. Innym sposobem jest wtłaczanie powietrza do środowiska gruntowo-wodnego w miejscu występowania zanieczyszczenia. Podczas tego procesu, zwanego biowentylacją, dochodzi do odparowania wraz ze strumieniem powietrza najbardziej lotnych składników zanieczyszczenia co zwiększa stopień oczyszczenia środowiska gruntowo-wodnego. Zdarzają się również przypadki, w których naturalne środowisko ubogie jest w mikroorganizmy zdolne do metabolizowania zanieczyszczeń naftowych. W takich sytuacjach konieczne jest wprowadzanie do zanieczyszczonego środowiska biopreparatów zawierających aktywne mikroorganizmy o znanych zdolnościach metabolicznych (bioaugmentacja). Mikroorganizmy wprowadza się do gruntu najczęściej w postaci ciekłych zawiesin. Sposób ten nie jest bez wad. Wprowadzenie do środowiska mikroorganizmów, które nie są dla niego naturalne niesie ze sobą zagrożenie zachwiania naturalnej równowagi ekologicznej oczyszczanego terenu. Ponadto biopreparat trzeba wprowadzać do środowiska gruntowo-wodnego kilkakrotnie. Umożliwia to uzyskanie odpowiedniej koncentracji mikroorganizmów i efektywny przebieg procesu biodegradacji zanieczyszczeń naftowych [49, 50]. Niedostępność zanieczyszczeń naftowych dla drobnoustrojów z powodu ich hydrofobowości i braku rozpuszczalności w wodzie stanowi odrębny problem utrudniający biodegradację produktów naftowych [51]. Zwiększenie biodostępności produktów naftowych można osiągnąć poprzez stosowanie surfaktantów [52], które zmniejszają napięcie powierzchniowe powodując lepszą dyspersję hydrofobowych zanieczyszczeń w wodzie [53]. Brak wiedzy o losie tych substancji w środowisku ogranicza ich szerokie stosowanie, szczególnie w warunkach *in situ* [54]. Alternatywą dla syntetycznych surfaktantów są naturalnie produkowane przez drobnoustroje biosurfaktanty [rozdział 2.6]. Zaletą biosurfaktantów jest ich różnorodność strukturalna, większa efektywność i mniejsza toksyczność w porównaniu z surfaktantami syntetycznymi oraz krótsza obecność w środowisku z powodu ich większej biodegradowalności [55].

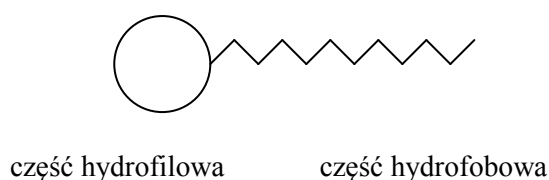
### 2.3. BIOSURFAKTANTY

Biosurfaktanty to surfaktanty pochodzenia biologicznego [56, 57], czyli związki powierzchniowo czynne, charakteryzujące się aktywnością powierzchniową

w roztworach wodnych. Przejaw ich aktywności powierzchniowej to głównie zdolność do adsorbowania się na granicy faz, zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego i międzyfazowego, zdolność do tworzenia stabilnych emulsji lub mikroemulsji oraz dobre właściwości zwilżające, myjące i piorące.

### 2.3.1. BUDOWA CHEMICZNA

Biosurfaktanty to cząsteczki o budowie amfifilowej, zawierające część hydrofilową zwaną „głową” i część hydrofobową zwaną „ogonem” (Rys. 1).



Rys. 1. Schemat budowy biosurfaktantu.

Część hydrofilowa wykazuje powinowactwo do substancji polarnych, podczas gdy część hydrofobowa wykazuje duże powinowactwo do cieczy niepolarnych i brak powinowactwa do wody [58]. Obecność części hydrofilowej odpowiada za rozpuszczanie się biosurfaktantów w wodzie, natomiast część hydrofobowa decyduje o rozpuszczalności biosurfaktantów w olejach i innych cieczach niepolarnych oraz wpływa na ich koncentrację w przestrzeni międzyfazowej [59]. Część hydrofilową biosurfaktantów mogą stanowić węglowodany, aminokwasy, cykliczne peptydy, alkohole, estry, grupy fosforanowe, karboksylowe, hydroksylowe, sulfonowe i inne. Natomiast grupa hydrofobowa biosurfaktantów może być zbudowana z białek, peptydów o wysokiej zawartości łańcuchów hydrofobowych, ale najczęściej z długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, hydroksykwasów tłuszczowych lub  $\alpha$ -alkilo- $\beta$ -hydroksykwasów tłuszczowych [60].

### 2.3.2. PODZIAŁ BIOSURFAKTANTÓW

Klasyfikacja biosurfaktantów opiera się na ich budowie chemicznej. Wyróżnia się następujące grupy surfaktantów pochodzenia naturalnego:



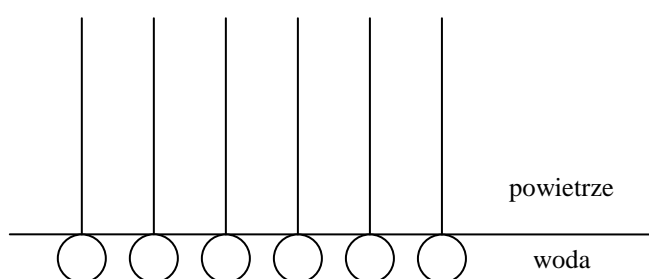
- glikolipidy składają się z lipidu oraz z jednostek cukrowych takich jak trehaloza, soforoza, ramnoza, celobioza, glukoza; umożliwiają mikroorganizmom pobieranie słabo polarnych węglowodorów,
- liposacharydy to zewnątrzkomórkowe, rozpuszczalne w wodzie emulgatory o dużej masie cząsteczkowej produkowane przez bakterie rozkładające węglowodory np. *Acinetobacter calcoaceticus* (emulsan),
- lipopeptydy np. lipidy ornitynowe i subtylizyna produkowane przez *Bacillus subtilis* są najbardziej efektywnymi biosurfaktantami, zbudowanymi z kwasu tłuszczowego i przyłączonego do niego peptydu,
- fosfolipidy obecne w każdej komórce jako składnik błony komórkowej, ale również produkowane na zewnątrz komórki np. przez *Corynebacterium lepus*, zbudowane z dwóch cząsteczek kwasu tłuszczowego i reszty fosforanowej przyłączonych do cząsteczki glicerolu,
- kwasy tłuszczowe i obojętne lipidy [61].

### 2.3.3. WŁAŚCIWOŚCI

Biosurfaktanty dzięki swej amfifilowej budowie charakteryzują się aktywnością powierzchniową, która przejawia się przede wszystkim w ich zdolności do obniżania napięcia powierzchniowego roztworów wodnych. Napięcie powierzchniowe odnosi się do sił działających na powierzchni fazy ciekłej graniczącej z fazą gazową i jest wynikiem niezrównoważenia sił działających na cząsteczki znajdujące się na powierzchni cieczy i wewnątrz cieczy. Napięcie powierzchniowe jest wielkością stałą charakterystyczną dla każdej cieczy, zależną od temperatury i od środowiska, z którym ta ciecz się styka. Napięcie powierzchniowe osiąga minimum przy tzw. krytycznym stężeniu micelarnym CMC, czyli stężeniu, przy którym cząsteczki związków powierzchniowo czynnych zaczynają łączyć się w agregaty zwane micelami.

Innym przejawem aktywności powierzchniowej biosurfaktantów jest zdolność do gromadzenia się ich cząsteczek na granicy faz o różnej polarności [62], np. woda/powietrze, woda/olej, woda/ciało stałe. Cząsteczki związków powierzchniowo czynnych adsorbują się na powierzchni fazy ciekłej w ten sposób, że część hydrofilowa (polarna) skierowana jest do wnętrza cieczy, a część hydrofobowa na zewnątrz cieczy

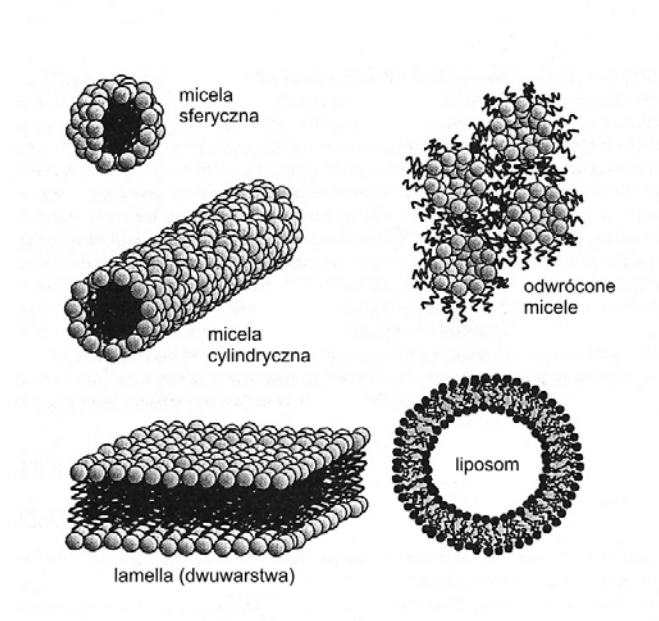
(Rys. 2) w wyniku czego napięcie powierzchniowe się obniża [63]. Adsorbowanie się cząsteczek na powierzchni fazy ciekłej powoduje, że stężenie substancji rozpuszczonej w warstwie powierzchniowej zwykle różni się od stężenia substancji rozpuszczonej w warstwach niższych. Cząsteczki związków powierzchniowo czynnych adsorbują się na powierzchni granicy faz tym lepiej, im bardziej widoczna jest w nich asymetria grup hydrofilowych i hydrofobowych [64].



Rys. 2. Schemat monomolekularnej warstwy cząsteczek biosurfaktantu na powierzchni wody.

W wielu przypadkach biosurfaktanty charakteryzują się zdolnością do tworzenia roztworów koloidalnych, w których fazę rozproszoną stanowią dynamiczne agregaty: micelle kuliste, micelle cylindryczne, pęcherzyki, a także do tworzenia warstw podwójnych w układach lamelarnych, błonach komórkowych i podobnych strukturach (Rys. 3). W procesie otrzymywania emulsji ważną rolę odgrywa różnica napięć powierzchniowych między cieczami. Im jest ona mniejsza, tym łatwiej powstaje emulsja. W przypadku, gdy napięcie międzyfazowe osiągnie wartość poniżej 1 N/m, emulsja powstaje samorzutnie. Zmniejszenie napięcia międzyfazowego można wywołać dodatkiem substancji, które tworzą monowarstwę molekularną na powierzchni kropelek dyspergowanej cieczy. Emulsja jest układem heterogenicznym, w którym obie fazy występują w stanie ciekłym i charakteryzują się brakiem wzajemnej mieszalności faz lub bardzo ograniczoną rozpuszczalnością. Charakterystyczną cechą warstw adsorpcyjnych biosurfaktantów na granicy faz woda/olej jest możliwość obniżenia napięcia międzyfazowego do bardzo małych wartości, często zbliżonych do zera, a bardzo małe napięcia międzyfazowe są odpowiedzialne za tworzenie tzw. mikroemulsji. Mikroemulsja to termodynamicznie trwały, optycznie izotropowy i transparentny, jednofazowy układ, złożony z wody, węglowodoru i surfaktantu [65].

W skali makroskopowej jest mieszaniną homogeniczną, natomiast w skali molekularnej – heterogeniczną [66].



Rys. 3. Przykłady agregatów tworzonych przez cząsteczki biosurfaktantów [67].

Biosurfaktanty w roztworach wodnych o niskich stężeniach występują w postaci pojedynczych cząsteczek, dimerów lub niewielkich agregatów. Wraz ze wzrostem stężenia tworzą się coraz większe agregaty, aż wreszcie dochodzi do formowania micel [68]. W micelach występuje określona orientacja cząsteczek związków powierzchniowo czynnych. Hydrofilowe głowy polarne skierowane są na zewnątrz w kierunku wody, a hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe skierowane są do wnętrza, unikając w ten sposób kontaktu z wodą. Roztwory micelarne mają zdolność rozpuszczania związków trudno rozpuszczalnych. Jest to tzw. proces solubilizacji [65]. Dodatni wpływ na solubilizację ma wzrost długości łańcucha węglowodorowego surfaktantu (obniżenie CMC i zwiększenie liczby agregacji), dodatek elektrolitu oraz rozpuszczalnych związków organicznych, mających wpływ na wartość CMC i liczbę agregacji. Natomiast ujemnie na solubilizację wpływa m.in. rozgałęzienie hydrofobowej części surfaktantu, duże stężenie elektrolitu, większe ilości alkoholi o krótkich łańcuchach węglowodorowych.

Biosurfaktanty cechują się wysoką specyficnością działania, wysoką aktywnością powierzchniową, stabilnością temperaturową i odpornością na zmiany pH w szerokim zakresie [69, 70]. Są one związkami zazwyczaj nietoksycznymi, które łatwo

ulegają biodegradacji [71], nie akumulują się w naturalnych ekosystemach, więc nie stwarzają zagrożeń ekologicznych. Główną fizjologiczną rolą biosurfaktantów jest umożliwienie bakteriom i grzybom, które je produkują, wykorzystywania do wzrostu nierozpuszczalnych w wodzie substancji odżywczych. Stąd większość mikroorganizmów produkujących biosurfaktanty posiada zdolność rozkładania węglowodorów. Te związki powierzchniowo czynne, które są uwalniane na zewnątrz komórki powodują emulgowanie węglowodorów, natomiast te które są związane ze ścianą komórkową ułatwiają penetrację węglowodorów do przestrzeni peryplazmatycznej. Biosurfaktanty powodują zwiększenie dostępności nierozpuszczalnych w wodzie substratów. Ich obecność powoduje przechodzenie substancji ciekłych do micel, a następnie rozprowadzanie ich po powierzchni komórki. W przypadku substratów będących ciałami stałymi obecność biosurfaktantów powoduje zwilżanie i dyspergowanie tych substancji, w wyniku czego zwiększa się ich powierzchnia. Mikroorganizmy wykazują wiele przystosowań do możliwości wykorzystywania węglowodorów jako substratu pokarmowego. W czasie wzrostu w ścianie komórkowej mikroorganizmów następują zmiany polegające na zwiększeniu jej hydrofobowości, dzięki czemu biosurfaktanty związane ze ścianą komórkową, takie jak lipidy trehalozowe ułatwiają wiązanie i w konsekwencji pasywny transport substratów do wnętrza komórek mikroorganizmów. Związki powierzchniowo czynne wydzielane na zewnątrz komórki, np. lipidy ramnozowe i soforozowe poprzez tworzenie micel powodują pseudosolubilizację węglowodorów i zwiększenie ich powierzchni [136].

Biosurfaktanty odgrywają zasadniczą rolę w ułatwianiu poruszania mikroorganizmom, które je produkują, ponadto biorą udział w fizjologicznych procesach komórkowych takich jak sygnalizowanie czy różnicowanie komórek, jak również w tworzeniu biofilmów [72]. Posiadają też właściwości o znaczeniu terapeutycznym i biomedycznym takie jak działanie antybakteryjne [73, 74], antygrzybicze i antywirusowe, hamują tworzenie skrzepów fibrynowych i wykazują działanie antyadhezyjne w stosunku do niektórych mikroorganizmów patogennych [75].

Mikroorganizmy produkują wielko- i małowcząsteczkowe biosurfaktanty. Małowcząsteczkowe to głównie glikolipidy i lipopeptydy, które są bardziej efektywne w obniżaniu napięcia powierzchniowego i międzyfazowego. Natomiast

wielkocząsteczkowe to polisacharydy, lipopolisacharydy, które są efektywne w stabilizowaniu emulsji typu olej w wodzie. Masa cząsteczkowa biosurfaktantów wynosi od 500 do 1500 Da, a ich CMC od 1 do 200 mg/l [72].

#### 2.3.4. OTRZYMYWANIE

Biosurfaktanty są produkowane jako uboczne produkty metabolizmu [76], głównie przez bakterie tlenowe podczas ich wzrostu na rozpuszczalnych w wodzie lub hydrofobowych substratach [77]. Zwykle do produkcji biosurfaktantów substratami są węglowodory, ponieważ ich funkcja jest związana z ułatwianiem mikroorganizmom pobierania hydrofobowych związków. Jednak stosowanie węglowodorów jako substratów wymaga włożenia większej energii w celu uzyskania odpowiedniej dyspersji. Problem ten nie istnieje w przypadku związków rozpuszczalnych w wodzie, dlatego stosowanie ich jako substratów również ma swoje zalety. Biosurfaktanty mogą być wydzielane na zewnątrz lub być związane z powierzchnią komórki. Pomimo swych wielu zalet nie są produkowane na dużą skalę ze względów ekonomicznych. Szacuje się, że koszty surowców stanowią od 10 do 30% całkowitych kosztów produkcji w większości procesów biotechnologicznych. W związku z tym można obniżyć koszty surowców stosując tanie, pochodzące z przemysłu rolniczego [78] lub odpadowe substraty np. oleje pochodzenia roślinnego [79] takie jak rzepakowy, kukurydziany, słonecznikowy, sojowy, odpady z rafinacji olejów, odpady z przemysłu tłuszczowego takie jak łój, olej ze zwierząt morskich, smalec, substancje wysokoskrobiowe takie jak odpady z przerabiania ziemniaków, zbóż, nasion jadalnych, serwatkę z przemysłu mleczarskiego czy ścieki z gorzelnii.

Ważnym krokiem do obniżenia kosztów pozyskiwania biosurfaktantów jest zwiększenie wydajności ich produkcji i izolacji, bowiem efektywny i ekonomiczny proces produkcji i separacji jest fundamentem do zyskowego otrzymywania bioproduktu. Poza rodzajem substratu na ilość i jakość wyprodukowanych mikrobiologicznie surfaktantów wpływa skład podłoża do hodowli mikroorganizmów produkujących te związki. Znaczący wpływ mają takie składniki jak azot, żelazo i mangan np. ograniczenie azotu zwiększa produkcję bioproduktów u *Pseudomonas aeruginosa* BS-2 i *Ustilago maydis*. Stosunek pierwiastków C:N, C:P, C:Fe czy C:Mg również wpływa na produkcję biosurfaktantów, dlatego właściwy dobór tych proporcji zwiększa wydajność produkcji naturalnych surfaktantów. Niemniej jednak standardowe

metody optymalizacji składu podłoża do hodowli pozwalają na zmianę zawartości tylko jednego pierwiastka podczas jednego eksperymentu, pozostawiając zawartości pozostałych pierwiastków na ustalonym poziomie, dlatego jest to proces czasochłonny, pracochłonny i nie daje pewności uzyskania optymalnego podłoża do produkcji bioproduktu. Rozwiązaniem tego problemu jest stosowanie statystycznej optymalizacji opartej na metodologii odpowiedzi powierzchni [80]. Metoda ta została zastosowana ze skutkiem pozytywnym do określenia optymalnego podłoża i optymalnych warunków hodowli dla zwiększonej produkcji surfaktyny przez szczep *Bacillus subtilis* oraz do zwiększenia produkcji biosurfaktantów przez szczep *Pseudomonas aeruginosa* AT 10 [75]. Nawet jeżeli produkcja biosurfaktantów jest prowadzona przy optymalnym składzie podłoża i przy optymalnych warunkach to proces ten jest niekompletny bez efektywnego i ekonomicznego sposobu izolacji produktu z podłoża po hodowli. Dla wielu produktów biotechnologicznych procesy separacji pochłaniają ok. 60% całkowitych kosztów produkcji.

Izolacja biosurfaktantów zależy od ich ładunku jonowego, rozpuszczalności w wodzie i ich umiejscowienia (wewnętrzne, zewnętrzne lub związane z komórką). Najczęściej stosowane konwencjonalne techniki izolacji biosurfaktantów to wytrącanie kwasem, siarczanem amonu, acetonem, ekstrakcja z użyciem butanolu, octanu etylu, pentanu, heksanu oraz mieszanin chloroform-metanol, dichlorometan-metanol, krystalizacja, wirowanie. Najczęściej techniki te stosowane są razem w różnych kombinacjach np. najpierw strącanie a następnie wirowanie lub strącanie a później ekstrakcja itp. Badania wskazują, że ciągle usuwanie biosurfaktantów podczas procesu fermentacji poprzez zastosowanie różnych technik powoduje wzrost stężenia komórek w reaktorze i zwiększenie produkcji skutkiem czego jest kilkakrotny wzrost wydajności procesu [81], a także znacząca redukcja kosztów. Wśród niekonwencjonalnych, ale zarazem interesujących i skutecznych metod izolowania biosurfaktantów z hodowli ciągłej wymienić można: frakcjonowanie piany, filtrację z przepływem krzyżowo-prądowym, adsorpcję na żywicach polistyrenowych, adsorpcję na węglu aktywnym, diafiltrację, ultrafiltrację i chromatografię jonowymienną [82].

Wyżej wymienione metody izolacji biosurfaktantów opierają się na ich następujących właściwościach:

- wytrącanie kwasem – biosurfaktanty stają się nierozpuszczalne przy niskim pH,
- wytrącanie siarczanem amonu – wysalanie polimerowych i bogatych w białka biosurfaktantów powoduje ich strącanie,
- ekstrakcja rozpuszczalnikami – biosurfaktanty są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach dzięki obecności hydrofobowego ogona,
- wirowanie – nierozpuszczalne biosurfaktanty opadają pod wpływem siły odśrodkowej,
- frakcjonowanie piany – biosurfaktanty dzięki aktywności powierzchniowej tworzą pianę,
- filtracja membranowa – biosurfaktanty powyżej krytycznego stężenia micelnego tworzą micelle, które zatrzymywane są przez membrany porowate,
- adsorbcja na żywicach polistyrenowych lub na węglu aktywnym - biosurfaktanty adsorbują się na sorbencie, a następnie są desorbowane przy pomocy rozpuszczalników organicznych,
- chromatografia jonowymienna – naładowane biosurfaktanty przyłączają się do żywic jonowymiennych a następnie są wymywane przy pomocy odpowiednich buforów [83].

### 2.3.5. ZASTOSOWANIA

Biosurfaktanty charakteryzuje zdolność do: obniżania napięcia powierzchniowego i międzyfazowego [84], tworzenia oraz destabilizacji emulsji (rozdziół faz), solubilizacji związków hydrofobowych w roztworach wodnych, tworzenia pian i żeli, wyodrębniania metali, zwilżania, czyszczenia, flokulacji, hamowania lub stymulowania wzrostu mikroorganizmów.

W zależności od potencjalnego zastosowania, biosurfaktanty powinny charakteryzować się wysoką lub niską aktywnością biologiczną, np. związki powierzchniowo czynne używane do oczyszczania gleb i wód, czy jako dodatki do żywności lub środki higieny osobistej nie powinny wykazywać aktywności biologicznej

ani być toksyczne. Natomiast biosurfaktanty stosowane jako środki antybakteryjne, antygrzybiczne, antywirusowe, wspomagające działanie pestycydów, herbicydów czy defoliantów powinny działać w jak najmniejszym stężeniu.

Biosurfaktanty stosuje się do zwiększenia efektywności pozyskiwania ropy naftowej, gdyż tradycyjnymi metodami nie udaje się wydobyć więcej niż 50 % zawartości pokładów. Wykorzystuje się je jako środki do zwilżania skały, micelnego zawadniania, emulgowania, deemulgowania, redukcji lepkości ciężkiej ropy naftowej [85]. Mikrobiologiczne metody intensyfikacji wydobywania ropy naftowej (MEOR - microbial enhanced oil recovery) polegają na dodawaniu do wody, pompowanej do prawie wyczerpanych pokładów ropy, biosurfaktantów lub produkujących je mikroorganizmów, których właściwości powierzchniowe umożliwiają wydobywanie pozostałości. Dzięki tej metodzie można uzyskać 30 % wzrost wydobywania ropy naftowej [61].

Biosurfaktanty są ekologicznie bezpieczne [86, 87] i dlatego stosuje się je do usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych z wód i gleb oraz nierozpuszczalnych w wodzie związków toksycznych [88, 89]. W metodach *in situ* wykorzystuje się mieszane kultury mikroorganizmów, zdolnych do wytwarzania biosurfaktantów. Natomiast w metodach *ex situ* wykorzystuje się biosurfaktanty, które są wyizolowane z hodowli mikroorganizmów i częściowo podczyszczone. Związki powierzchniowo czynne obniżając napięcie międzyfazowe olej/woda, zwilżają powierzchnię substancji hydrofobowych w wyniku czego wzrasta ich dyspersja w wodzie, a tym samym dostępność dla obecnych w środowisku mikroorganizmów. Ma to zasadniczy wpływ na efektywność procesu biodegradacji zanieczyszczeń. W procesach tworzenia emulsji typu olej w wodzie biosurfaktanty są bardziej selektywne w porównaniu z surfaktantami syntetycznymi, a poza tym używa się ich znacznie mniej, co ma duże znaczenie ekonomiczne i ekologiczne.

Biosurfaktanty są wykorzystywane podczas produkcji olejów smarowych oraz benzyny [90]. Stosuje się je także do usuwania wycieków ropy naftowej, do oczyszczania kolumn piaskowych z benzyny, do odzyskiwania bituminu z piasku roponośnego, do usuwania z gleby heksachlorobifenylu oraz metali ciężkich mających właściwości rakotwórcze [91, 92, 93]. Wykorzystywane są również przez przemysł celulozowo-papierniczy [94], górniczy, metalurgiczny [95], a także rolnictwo do



rozpuszczania i rozdrabniania nawozów sztucznych i pestycydów. W przemyśle kosmetycznym [96] stosowane są ze względu na brak toksyczności, znakomite właściwości zwilżające oraz łagodne działanie na skórę. Lipidy soforozowe są używane do produkcji kosmetyków o właściwościach nawilżających skórę. Lipidy soforozowe i ramnozowe wykorzystuje się również w przemyśle farmaceutycznym jako pomocnicze środki emulgujące do transportu leków w miejsce ich działania, do uzupełniania surfaktantu płucnego jak również jako środki wspomagające do szczepionek [97]. Niektóre biosurfaktanty znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym [98] jako środki konserwujące [88], emulgatory do przetwarzania surowców, gdzie odgrywają znaczącą rolę w uzyskiwaniu dokładnie wymaganej konsystencji produktów [99], np. lipidy soforozowe stanowią dodatki do pieczywa, podnosząc jego jakość i przedłużając czas przydatności do spożycia. Inną cechą biosurfaktantów jest ich zdolność do hamowania korozji metali [100].

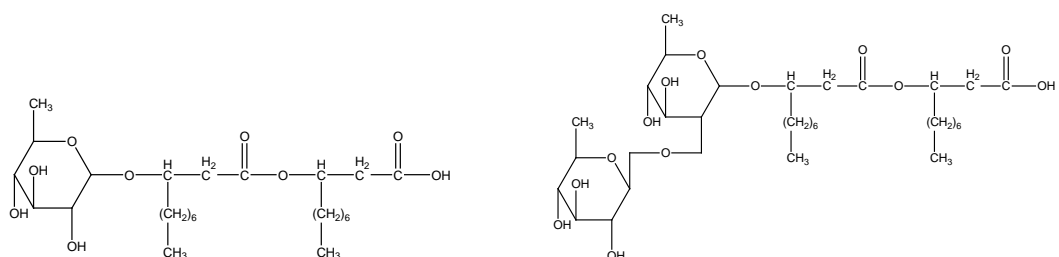
Zalety biosurfaktantów w porównaniu z surfaktantami syntetycznymi:

- aktywność powierzchniowa i międzyfazowa: są bardziej efektywne i wydajne, mają mniejsze CMC dzięki czemu mniejsza ilość powoduje większe obniżenie napięcia powierzchniowego,
- tolerancja na zmiany temperatury: niektóre biosurfaktanty np. ramnolipidy nie ulegają rozkładowi ani nie tracą właściwości powierzchniowych nawet w temperaturze 90 °C,
- tolerancja na zmiany siły jonowej: biosurfaktanty nie ulegają strąceniu ani wysalaniu nawet w roztworach zawierających 10% soli podczas gdy chemiczne surfaktanty ulegają dezaktywacji już w 2-3% roztworach soli
- tolerancja na zmiany pH w szerokim zakresie,
- większa biodegradowalność: biosurfaktanty są łatwo rozkładane w wodzie i glebie,
- rozkład emulsji: emulsje tworzone z użyciem biosurfaktantów można łatwo złamać poprzez dodanie odpowiedniego enzymu,
- niższa toksyczność [101],
- możliwość produkcji z odpadowych surowców [102].

## 2.4. RAMNOLIPIDY

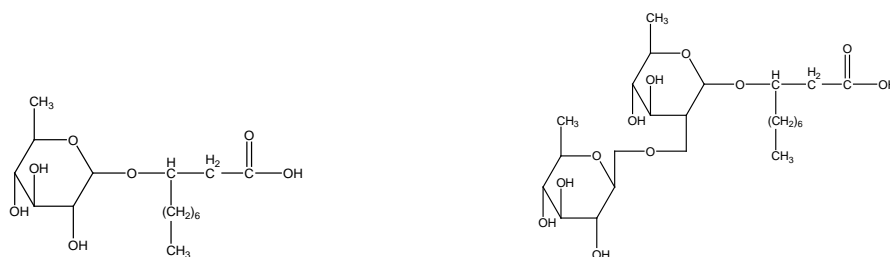
Ramnolipidy należą do glikolipidów, które są najbardziej powszechną klasą biosurfaktantów produkowanych przez mikroorganizmy. Są najczęściej izolowanymi i najlepiej poznanymi zewnątrzkomórkowymi biosurfaktantami wytwarzanymi głównie przez szczep *Pseudomonas aeruginosa*. Bakterie tego gatunku zdolne są do wytwarzania sześciu różnych ramnolipidów, które posiadają podobną budowę chemiczną i aktywność powierzchniową a ich średnia masa cząsteczkowa wynosi 577 Da. Ramnolipidy redukują napięcie powierzchniowe roztworów wodnych do 30 mN/m a ich krytyczne stężenie micelarne zawiera się w zakresie 24-54 mg/l. Cząsteczka ramnolipidu składa się z jednej lub dwóch cząsteczek ramnozy przyłączonych do jednej, dwóch lub trzech cząsteczek kwasów tłuszczowych o długości łańcucha węglowego od 8 do 12 atomów. Ramnolipidy produkowane są jako mieszanina homologów (Rys. 4), które mogą różnić się długością łańcucha kwasu tłuszczowego lub ilością jednostek ramnozy. Ramnolipidy z dłuższymi łańcuchami kwasów tłuszczowych są bardziej hydrofobowe, natomiast gdy ramnoza występuje w postaci dimeru mają bardziej hydrofilowy charakter. Różnice w budowie chemicznej mogą wpływać na aktywność powierzchniową i stabilność ramnolipidów w fazie wodnej. Najczęściej spotykane formy ramnolipidów to monoramnolipid i diramnolipid składające się z kwasu hydroksydekanowego oraz odpowiednio jednej lub dwóch cząsteczek ramnozy [103]. Skład produkowanej mieszaniny ramnolipidów zależy od substratu i warunków hodowli. Ramnolipidy mogą być produkowane zarówno z substratów hydrofobowych jak i hydrofilowych [104]. Szczep *Pseudomonas aeruginosa* zdolny jest do produkcji ramnolipidów z takich substratów jak glukoza, fruktoza, mannoza, melasa, glicerol, mannitol, olej roślinny (np. słonecznikowy, sojowy, babassu), n-parafiny, heksadekan, olej parafinowy, kwas mlekowy, pepton, kwas palmitynowy, stearynowy, oleinowy, linolowy, bursztyniany, pirogroniany, cytryniany [60, 85, 94, 99, 105, 106]. Synteza ramnolipidów zależy od stężenia komórek w hodowli i jest najbardziej efektywna w fazie stacjonarnej [107]. Ograniczenie składników mineralnych powoduje zmniejszenie wzrostu mikroorganizmów i zwiększoną produkcję ramnolipidów. Standardowo stosuje się zmniejszenie ilości azotu jednak okazuje się, że najbardziej efektywne jest ograniczenie fosforu, które powoduje nawet 5-krotny wzrost produkcji ramnolipidów w porównaniu do hodowli z ograniczonym azotem. Podobne rezultaty

można osiągnąć przez zmniejszenie ilości siarki w podłożu, podczas gdy ograniczenie magnezu daje gorsze wyniki, a zmniejszona ilość wapnia i żelaza nie wpływa hamująco na wzrost komórek.



Ramnolipid 1 (Rha-C<sub>10</sub>C<sub>10</sub>)

Ramnolipid 2 (Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>)



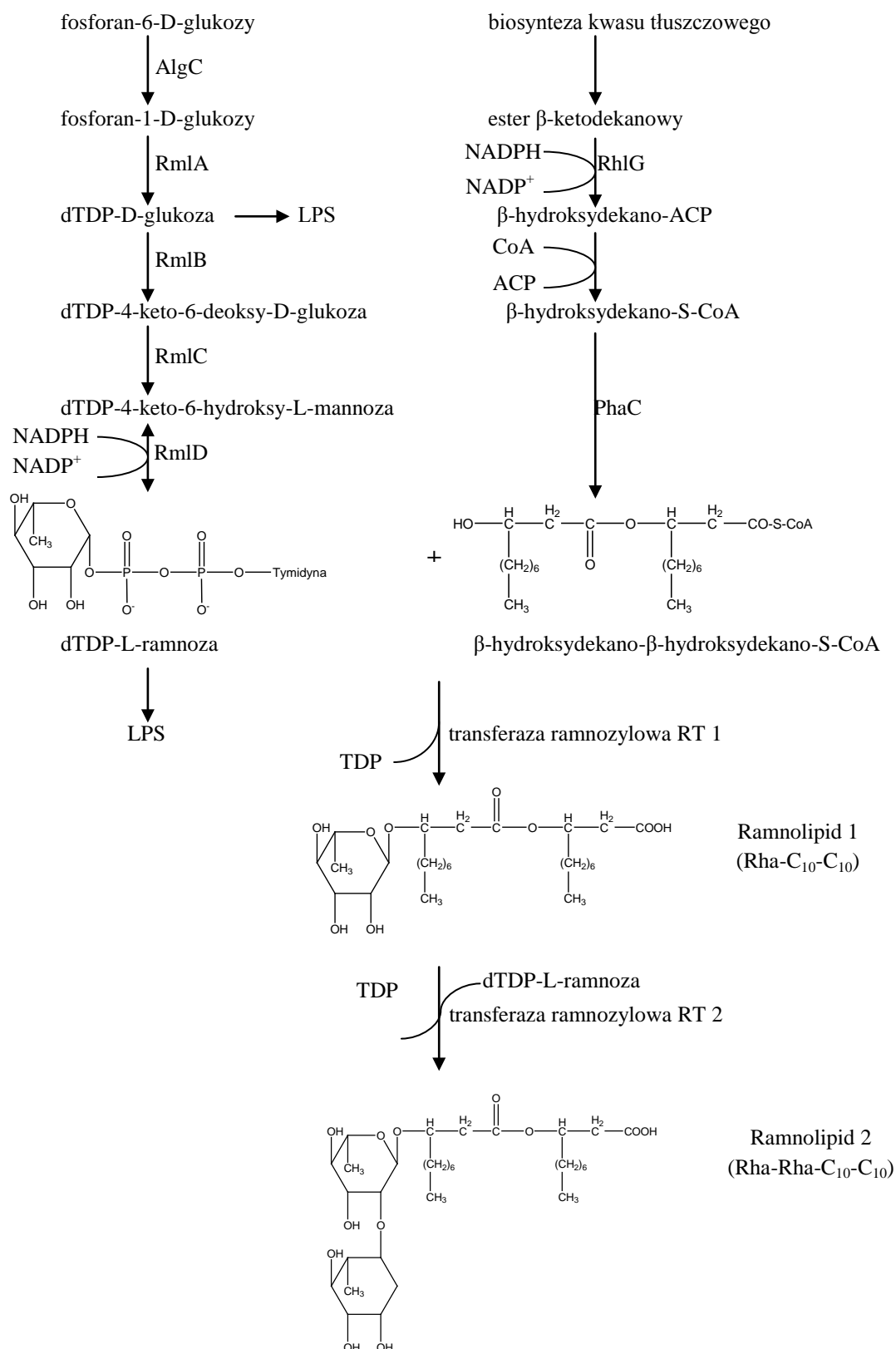
Ramnolipid 3 (Rha-C<sub>10</sub>)

Ramnolipid 4 (Rha-Rha-C<sub>10</sub>)

Rys. 4. Najczęściej spotykane struktury ramnolipidów.

### 2.4.1. BIOSYNTENZA

Biosynteza ramnolipidów obejmuje dwie kolejne reakcje przeniesienia ramnozy katalizowane przez specyficzne transferazy ramnozyłowe (RT 1 i RT 2). Szlak biochemiczny syntezy ramnolipidów przedstawia rysunek (Rys. 5). Donorem ramnozy w obu reakcjach jest deoksytymidynodifosforamnoza (dTDP-L-ramnoza), która reaguje w pierwszej reakcji z  $\beta$ -hydroksydekano- $\beta$ -hydroksydekanianem a w drugiej reakcji z monoramnolipidem. Enzym RT 1 składa się z dwóch polipeptydów kodowanych przez geny *rhlA* i *rhlB*. Enzym RT 1 jako substratu może używać  $\beta$ -hydroksykwasów zarówno przyłączonych do ACP jak również przyłączonych do CoA. Enzym RT 2 kodowany przez gen *rhlC* zaangażowany jest w biosyntezę lipopolisacharydu (LPS). Synteza cząsteczki kwasu tłuszczowego przebiega w obecności enzymu *RhlG* według ogólnego szlaku metabolicznego syntezy kwasów tłuszczowych. Substratem do syntezy dTDP-L-ramnozy jest fosforan-1-glukozy, a enzymy zaangażowane w tą syntezę są



Rys. 5. Schemat biosyntezy ramnolipidów Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> i Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> produkowanych przez *Pseudomonas aeruginosa* [108].

kodowane przez geny rlm. Za transformację fosforanu-6-glukozy w fosforan-1-glukozy odpowiedzialny jest enzym AlgC [97, 108, 109, 110].

#### 2.4.2. WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIA

Ramnolipidy posiadają silne właściwości powierzchniowo czynne, obniżają napięcie powierzchniowe do 25-30 mN/m oraz napięcie międzyfazowe heksadekan/woda do 1 mN/m [103]. Ramnolipidy charakteryzują się wysoką aktywnością antybakteryjną i antywirusową [111] dzięki czemu mogą być stosowane jako pestycydy. Ramnolipidy są związkami nietoksycznymi [112] używanymi jako dodatki do kosmetyków, a także do tworzenia liposomów i emulsji co jest istotne w przemyśle kosmetycznym. Mogą służyć również jako źródło ramnozy [106], która jest wartościowym związkiem chemicznym produkowanym przez ekstrakcję kwercetyny z kory dębowej, naringiny ze skórek cytrusów lub rutyny z kory dębowej lub innych roślin. Proces ten wymaga toksycznych, korozyjnych chemikaliów i generuje ogromne ilości uporczywych aromatycznych odpadów. Ramnolipidy produkowane podczas fermentacji mogą być łatwo zhydrolizowane w celu oddzielenia ramnozy. Jest to przyjazna środowisku alternatywa dla produkcji ramnozy. Zdolność ramnolipidów do efektywnego emulgowania surowej ropy naftowej, benzenu oraz mieszanin węglowodorów z wodą czyni je użytecznymi w bioremediacji [99]. Ramnolipidy mają zastosowanie w przemyśle rafineryjnym do zwiększania wydobycia ropy naftowej, do oczyszczania mórz i wybrzeży zanieczyszczonych węglowodorami, a także do oczyszczania terenów skażonych metalami ciężkimi. Mogą również służyć jako dodatki do betonu zwiększające jego wytrzymałość jednocześnie powodując oszczędność cementu. Ramnolipidy mogą być komercyjnie produkowane z wydajnością 100 g/l, co sprawia, że koszty ich produkcji są konkurencyjne w stosunku do kosztów produkcji syntetycznych surfaktantów [108].

#### 2.4.3. METODY IDENTYFIKACJI RAMNOLIPIDÓW

Metody służące do wykrywania, identyfikacji i oznaczania ilości ramnolipidów można podzielić na: pośrednie, kolorymetryczne i chromatograficzne. Metody pośrednie oparte są na badaniach właściwości fizycznych ramnolipidów, takich jak napięcie powierzchniowe czy aktywność hemolityczna. Metody kolorymetryczne umożliwiają oznaczanie stężeń substancji barwnych na podstawie absorpcji ich

roztworów w zakresie światła widzialnego. Jeśli badana substancja nie tworzy barwnych roztworów to można otrzymać jej barwne formy na drodze reakcji chemicznych, np. w wyniku reakcji kompleksowania. Metody chromatograficzne polegają na rozdzieleniu badanej mieszaniny związków, a następnie na detekcji poszczególnych składników. Ramnolipidy produkowane są przez drobnoustroje w postaci mieszaniny homologów. Metody chromatograficzne w przeciwieństwie do metod pośrednich i kolorymetrycznych, umożliwiają rozdzielenie mieszaniny ramnolipidów i analizę poszczególnych homologów [114].

Wśród metod pośrednich wyróżnia się:

- Pomiar napięcia powierzchniowego

Cząsteczki o budowie amfifilowej gromadzą się na granicy faz i powyżej CMC tworzą micide lub pęcherzyki. Poniżej CMC napięcie powierzchniowe i międzyfazowe wodnych roztworów związków powierzchniowo czynnych zależy od stężenia aktywnego związku. Właściwość tę wykorzystuje się do określania całkowitej ilości ramnolipidów. W celu wyznaczenia stężenia ramnolipidu należy sporządzić krzywą wzorcową, a badaną próbkę należy rozcieńczyć tak, żeby zawierała 1-50 mg/l ramnolipidu. Wadą tej metody jest jej wrażliwość również na inne związki powierzchniowo czynne, a także brak informacji o składzie próbki.

- Badanie aktywności hemolitycznej

Wykonuje się je na płytkach agarowych z krwią.  $\beta$ -hemoliza powoduje całkowity rozpad czerwonych krwinek, co widoczne jest na podłożu w postaci tworzących się jasnych stref wokół kolonii bakterii, podczas gdy  $\alpha$ -hemoliza powoduje częściową lizę czerwonych krwinek, w wyniku czego podłoże barwi się na zielono. Ta metoda nadaje się tylko do badań nowych szczepów bakterii pod kątem wytwarzania biosurfaktantów. Hemoliza nie jest reakcją specyficzną dla ramnolipidów, gdyż enzymy lityczne (np. proteazy), również przeprowadzają tę samą reakcję.

Do metod kolorymetrycznych należą:

- Test na agarze zawierającym CTAB (bromek cetylotrimetyloamoniowy)

Metoda oparta jest na tworzeniu nierozpuszczalnych par jonowych surfaktantów anionowych (ramnolipidy) z surfaktantami kationowymi (CTAB). Test wykonuje się na

plytkach agarowych zawierających CTAB i błękit metylenowy. Pojawienie się ciemnoniebieskiej barwy wokół kolonii oznacza wytwarzanie ramnolipidów przez badane szczepy bakterii. Istnieje związek między średnicą zabarwionych pól a stężeniem ramnolipidu. Pomimo, tego metoda ta nie nadaje się do określania ilości wytwarzanego ramnolipidu, ponieważ na średnicę zabarwionych pól wpływa wielkość kolonii, czas inkubacji, migracja ramnolipidów, a nawet poziom wypełnienia płytek agarem.

– Metoda antronowa

Test ten polega na reakcji ramnozy w obecności mocnego kwasu z antronem (9,10-dihydro-9-oksoantracen). W wyniku ogrzewania powstaje zabarwienie, które można zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 645 nm. Stężenie ramnolipidu odczytuje się z krzywej wzorcowej wykonanej dla ramnozy lub ramnolipidu. Jest to szybkie i łatwe oznaczenie. Obecność w badanej próbce niektórych substancji, np. rozpuszczalników, nieorganicznych soli, białek, substancji utleniających, zakłóca pomiar.

– Metoda orcynowa

Metoda ta jest oparta na reakcji ramnozy z orcyną (1,3-dihydroksy-5-metylobenzen) w obecności 60% kwasu siarkowego. Spektrofotometryczny pomiar absorbancji roztworu otrzymanego w wyniku w/w reakcji pozwala na oznaczenie stężenia ramnolipidu wobec krzywej wzorcowej dla ramnozy lub ramnolipidu. Absorbancję mierzy się przy długości fali 505 nm.

Metody chromatograficzne stosowane w jakościowej i ilościowej analizie ramnolipidów to:

– Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Metoda polega na rozdzieleniu składników występujących w badanej mieszaninie podczas jej przechodzenia przez fazę stacjonarną (adsorbent) osadzoną na płytce. Rozdział dokonuje się na podstawie zróżnicowanego powinowactwa składników próbki do adsorbentu. Położenie plamek na chromatogramie umożliwia analizę jakościową składników mieszaniny, a wielkość i intensywność ich zabarwienia - ilościową. Chromatografia TLC stosowana jest do określania składu ekstraktów ramnolipidów z podłoża pohodowlanego i do ich wstępnego oczyszczania na grubszej

chromatograficznej warstwie. Chromatografia w normalnym układzie faz na płytkach z żelalem krzemionkowym 60 i mieszaniną eluentów chloroform:metanol:woda/20% wodny roztwór kwasu octowego (65:15:2) pozwala na rozdzielanie ramnolipidów na zawierające monosacharydowe lub disacharydowe grupy polarne. TLC z użyciem płytek RP-8 oraz mieszaniny rozpuszczalników metanol-woda-kwas trifluoroctowy (90:10:0,25) umożliwia rozdział ramnolipidów ze względu na długość łańcucha alkilowego kwasu tłuszczowego. Powstałe w wyniku rozdziału homologii można zaobserwować na powstałym chromatogramie w postaci plamek, po wcześniejszym wybarwieniu odpowiednimi odczynnikami chemicznymi. Odczynniki wybarwiające odpowiednie dla ramnolipidów to np. difenylamina lub odczynniki specyficzne dla cukrów (antron, 4-metoksybenzoaldehyd) i kwasów tłuszczowych (zieleń bromokrezolowa, błękit bromotymolowy, 2',7'-dichlorofluoresceina). Porównanie czasów retencji rozdzielonych składników z czasami retencji standardowych substancji umożliwia zidentyfikowanie poszczególnych homologów. Metoda ta pozwala na analizowanie dużej ilości próbek o małej objętości i zużywa małe objętości organicznych rozpuszczalników w porównaniu z chromatografią kolumnową.

– Chromatografia gazowa (GC)

Zasadą metody jest rozdzielanie składników mieszaniny na długich i cienkich kolumnach. Oddziaływania występujące między rozdzielanymi składnikami a wypełnieniem kolumn hamują przepływ rozdzielanych związków chemicznych przez kolumnę. W wyniku tego jedne składniki mieszaniny opuszczają kolumnę wcześniej a inne – później. Odpowiedni detektor umożliwia identyfikację kolejno wychodzących z kolumny składników rozdzielanej mieszaniny. Metoda ta różni się od poprzedniej przede wszystkim tym, że w chromatografii cieczowej fazą ruchomą jest ciecz, a w chromatografii gazowej – gaz. Ramnolipidy analizuje się techniką chromatografii gazowej po wcześniejszej hydrolizie cząsteczek. W wyniku hydrolizy otrzymuje się mieszaninę ramnozy i kwasów tłuszczowych. Ramnoza jest analizowana ilościowo po uprzedniej derywatacji do estrów trimetylosilylowych. Nie dostarcza to jednak żadnych informacji na temat składu ramnolipidu. Dopiero analiza kwasów tłuszczowych lub ich estrów metylowych umożliwia identyfikację hydroksykwasów tłuszczowych w ramnolipidach.



– Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Zasada rozdzielania mieszanin tą metodą jest taka sama jak w chromatografii TLC. Różnica polega na tym, że w celu rozdzielania składników mieszanina przepływa przez fazę stacjonarną osadzoną w kolumnie a nie na płytce. Fazą ruchomą jest ciecz. Do rozdzielania ramnolipidów stosuje się kolumny z żelem krzemionkowym i odwróconym układem faz, z gradientem mieszaniny acetonitrylu i wody (30-70% acetonitrylu do 70-100% acetonitrylu). Jednak by określić ilość ramnolipidu potrzebny jest wzorzec. Ponadto przy zastosowaniu HPLC nie jest możliwe rozdzielanie izomerów strukturalnych (np. Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub> i Rha-C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>), które mogą być rozróżnione tylko przez posobną spektrometrię mas (MSMS). W przypadku stosowania HPLC-MS analizowane próbki powinny być oczyszczone, ponieważ sole i inne zanieczyszczenia wpływają na jonizację cząsteczek ramnolipidu, co oddziałuje na intensywność mierzonych sygnałów. Wysoka czułość metody HPLC-MS pozwala na analizę próbek o bardzo małych stężeniach ramnolipidów. Ponadto kiedy odpowiednio przygotuje się badaną próbkę to HPLC jest najbardziej odpowiednią metodą do identyfikacji i określania ilości ramnolipidów. Metoda umożliwia również analizowanie dużej ilości próbek.

#### 2.4.4. METODY IZOLACJI I OCZYSZCZANIA RAMNOLIPIDÓW

W celu wyizolowania wyprodukowanych przez bakterie ramnolipidów stosuje się szereg metod w zależności od sposobu prowadzenia hodowli. Inne metody wykorzystuje się do izolacji ramnolipidów z hodowli okresowych, a inne do izolacji z hodowli ciągłych. Pierwszym etapem zawsze jest jednak oddzielenie mikroorganizmów i zmniejszenie objętości roztworu. W skali laboratoryjnej mikroorganizmy po hodowli okresowej oddziela się poprzez wirowanie, które poprzedza etap izolacji [114]. Do okresowej separacji ramnolipidów z podłoża pohodowlanego i wstępnego ich oczyszczenia stosuje się następujące metody:

– Strącanie

Ramnolipidy ulegają strączeniu w obecności kwasu (najczęściej stosowany jest 1M HCl) lub siarczanu amonu [115]. Obniżenie pH powoduje, że ramnolipid przechodzi w formę kwasową, która jest nierozpuszczalna w wodzie. Osad można oddzielić od roztworu poprzez wirowanie, a następnie rozpuścić w odpowiednim buforze. W celu lepszego wytrącania zaleca się przechowywanie roztworu przez kilka

godzin w temp. 4 °C. Siarczan amonu również powoduje obniżenie pH i wytrącanie ramnolipidów przez wysalanie.

– Ekstrakcja rozpuszczalnikami

Ekstrakcja używana jest do oddzielenia ramnolipidów od związków hydrofilowych, które nie rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. W metodzie tej stosuje się jeden rozpuszczalnik np. octan etylu lub mieszaninę rozpuszczalników w różnych proporcjach np. chloroform-metanol (2:1). W celu zwiększenia wydajności ekstrakcji można wcześniej próbkę zakwasić, spowoduje to przejście ramnolipidów w formy protonowane, czyli mniej rozpuszczalne w wodzie.

– Selektowna krystalizacja

Selektywną krystalizację stosuje się po uprzednim strąceniu lub po ekstrakcji ramnolipidów z podłoża pochodowlanego i ponownym rozpuszczeniu w rozpuszczalniku organicznym. Kiedy ramnolipidy są skoncentrowane w rozpuszczalniku dodatek innego rozpuszczalnika, np. heksanu w połączeniu z obniżeniem temperatury powoduje selektywną krystalizację.

Podczas ciągłego procesu produkcji ramnolipidu trzeba stale odbierać ramnolipid z hodowli, gdyż duże jego stężenie powoduje zmniejszenie wydajności produkcji. Metodami wykorzystywanymi do izolacji i oczyszczania ramnolipidów w ciągłych procesach produkcyjnych są:

– Adsorpcja

W metodzie tej ramnolipid adsorbuje się na sorbencie podczas przepływu podłoża pochodowlanego przez kolumnę. Jako sorbenty wykorzystywane są żywice polistyrenowe, na których absorbują się hydrofobowe i amfifilowe substancje w wyniku hydrofobowych oddziaływań. Sterylne podłoże pochodowlane aplikuje się bezpośrednio na kolumnę zrównoważoną 0,1 M buforem fosforanowym o pH 6,1. Następnie przez kolumnę przepuszcza się wodę destylowaną, skutkiem czego jest usunięcie pigmentów i wolnych kwasów tłuszczowych. Kolejnym etapem jest wymycie ramnolipidów. Do tego celu najczęściej stosowany jest metanol. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymuje się surową mieszaninę ramnolipidów, której dalsze oczyszczanie można przeprowadzić z zastosowaniem metod chromatograficznych po ponownym

rozpuszczeniu ramnolipidów w odpowiednim buforze. Adsorbent podlega regeneracji przy pomocy 1 M NaOH.

Innym adsorbentem jest węgiel aktywny. Adsorpcja jest możliwa w zakresie pH 5-10 i temperaturze 40°C, desorpcja i regeneracja następuje z użyciem acetonu przy 30°C. Metoda ta pozwala odzyskać prawie 90% ramnolipidów.

Chromatografia adsorpcyjna reprezentuje doskonałą alternatywę dla ekstrakcji rozpuszczalnikami, ponieważ jest procesem ciągłym i zużywa mniejsze ilości rozpuszczalników.

#### – Wymiana jonowa

W wyższym pH ramnolipidy są naładowane ujemnie, więc można je oddzielać na słabych anionowych wymienniczkach w procesie chromatografii jonowymiennej. Wymieniacz anionowy jest równoważony przy pomocy buforu Tris HCl o pH 8 lub wyższym zawierającym 10% etanolu. Ramnolipidy wymywa się z kolumny buforem zawierającym 0,6 M NaCl. W celu usunięcia soli z frakcji ramnolipidowej stosuje się adsorpcję lub ekstrakcję. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymuje się stałą, higroskopijną mieszaninę ramnolipidów, która wciąż zawiera pewne ilości kwasów tłuszczowych i pigmentów. Żywicę jonowymienną można regenerować buforem zawierającym 2 M NaCl i 20% etanolu.

#### – Filtracja membranowa

Niskie pH, stężenie ramnolipidów wyższe od CMC, obecność białek i innych składników w podłożu powodują powstawanie micel. Micele są o 2-3 rzędy wielkości większe od pojedynczych cząsteczek, dlatego mogą być zatrzymywane przez membrany porowate o granicznej masie molowej 10 kDa. Bezpośrednia filtracja podłoża powoduje, że podczas separacji na membranie, w wyniku zagęszczenia, tworzy się warstwa żelu, która działa jak dodatkowa membrana. W konsekwencji ramnolipidy w postaci micel zatrzymywane są przez membranę, a mniejsze składniki płynu powodowanego takie jak sole mineralne, cukry, barwniki przechodzą przez membranę. Uzyskuje się w ten sposób oddzielenie małocząsteczkowych zanieczyszczeń od ramnolipidów.

#### – Frakcjonowanie piany

W procesie tym wykorzystuje się właściwości pianotwórcze ramnolipidów. Ramnolipidy koncentrują się na granicy faz powietrze/woda tworząc pianę. Piana jest zbierana w procesie potokowym do specjalnego zbiornika, a kiedy piana opadnie otrzymuje się czysty roztwór ramnolipidu.

Po oddzieleniu ramnolipidów od bakterii i substancji rozpuszczalnych w wodzie dalsze oczyszczanie przeprowadza się z wykorzystaniem technik chromatograficznych. Do mniejszych objętości stosuje się preparatywną chromatografię cienkowarstwową, podczas gdy próbki o większej objętości oczyszcza się na kolumnach chromatograficznych.

– Preparatywna chromatografia cienkowarstwową

Proces preparatywnej TLC jest bardzo podobny do analitycznej TLC. Próbki po ekstrakcji z płynu pochodzącego nanosi się na preparatywne płytki TLC z żelem krzemionkowym. Fazą ruchomą jest mieszanina rozpuszczalników chloroform-metanol-woda/kwas octowy (65:15:2). Zaadsorbowane na żelu krzemionkowym (osadzonym na płytce) ramnolipidy wymywa się metanolem lub mieszaniną chloroform-metanol. Opisana metoda jest prosta i nie wymaga używania drogiego sprzętu, ale nadaje się tylko do oczyszczania małych próbek.

– Chromatografia kolumnowa w normalnym układzie faz

Kolumnowa chromatografia w normalnym układzie faz jest standardową metodą separacji ramnolipidów z próbek o dużych objętościach. Zakwaszoną mieszaninę ramnolipidów, rozpuszczoną w rozpuszczalniku np. chloroformie, nanosi się na kolumnę z żelem krzemionkowym. Płukanie kolumny chloroformem powoduje wymywanie obojętnych lipidów oraz pigmentów. Ramnolipidy wymywa się z kolumny mieszaniną chloroform-metanol w stosunku 50:3 dla Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> i 50:50 dla Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>. Po odparowaniu rozpuszczalnika, pozostałość rozpuszcza się w roztworze zasadowym, następnie zakwasza i poddaje rekrytalizacji, w wyniku czego otrzymuje się ramnolipidy w postaci kryształów.

– Chromatografia kolumnowa w odwróconym układzie faz

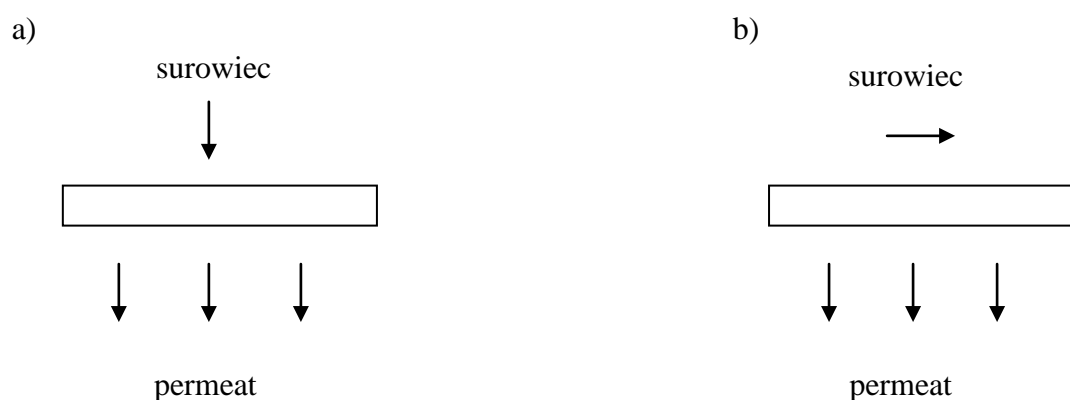
Na kolumnach chromatograficznych w odwróconym układzie faz następuje rozdzielanie mieszanin ramnolipidów według długości łańcuchów hydroksykwasyw tłuszczowych. Wstępnie oczyszczoną mieszaninę ramnolipidów zakwasza się,

a następnie nanosi na kolumnę RP18. Ramnolipidy rozdziela się izokratycznie używając mieszaniny acetonitrylu 70% i wody destylowanej 30%. Otrzymane frakcje ramnolipidów (głównie Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> i Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) wolne są od kwasów tłuszczowych i pigmentów. Ramnolipidy, które opuściły kolumnę poddaje się krystalizacji, w wyniku której otrzymuje się je w postaci białego proszku. Dodatkowe oczyszczanie nie jest konieczne.

## 2.5. SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW Z ZASTOSOWANIEM TECHNIK MEMBRANOWYCH

Pierwszym krokiem w procesie izolacji biosurfaktantów jest rozdzielenie biomasy i podłoża pochodowlanego. Najczęściej mikroorganizmy oddziela się poprzez wirowanie. Jednak metoda ta nie pozwala na uzyskanie sterylnego supernatantu, gdyż nie da się uniknąć przedostania pojedynczych komórek. Drobnoustroje rozmnażają się bardzo szybko i obecność substancji odżywczych w supernatancie sprzyja ich wzrostowi, co stanowi problem na dalszych etapach izolacji ramnolipidów. Ponadto wirowanie jest procesem energochłonnym [116], nieekonomicznym i często nieefektywnym. Alternatywą dla wirowania są techniki membranowe, w szczególności mikrofiltracja i ultrafiltracja [117]. Są to procesy ciśnieniowe, oparte na zasadzie rozdziału sitowego, wykorzystujące membrany porowate. Proces rozdziału opiera się na wykorzystaniu selektywnego działania membrany i różnicy ciśnień hydrostatycznych panujących po obu stronach membrany. Pod wpływem tych czynników jedne składniki mieszaniny są transportowane przez membranę tworząc strumień permeatu, a pozostałe tworzą strumień zatężony zwany retentatem. W mikrofiltracji używane są membrany symetryczne o grubości warstwy separującej 10-150  $\mu\text{m}$  i wielkości porów 0,2-10  $\mu\text{m}$ , natomiast w ultrafiltracji – membrany porowate asymetryczne (zbudowane z warstwy nośnej - suportu o grubości 50-150  $\mu\text{m}$  i warstwy separującej – naskórkowej o grubości od 0,1 do 1,0  $\mu\text{m}$ ). Ultrafiltracja stosowana jest do rozdzielania związków o średnicach 1-100 nm czyli odpowiednio o masie molowej 5-100 kDa [118]. Oba te procesy nie wymagają dużego zużycia energii, gdyż ciśnienia niezbędne do separacji wynoszą w przypadku mikrofiltracji < 0,3 MPa, a dla ultrafiltracji < 1MPa. Procesy filtracyjne mogą przebiegać w układzie z przepływem jednokierunkowym (ang. *dead-end*) lub krzyżowo-prądowym (ang. *cross-flow*) (Rys. 6). W układzie jednokierunkowym

surowiec i permeat przepływają prostopadle do membrany, podczas gdy w układzie krzyżowo-prądowym surowiec przepływa stycznie, a permeat prostopadle do powierzchni membrany. Gdy surowiec przepływa przez membranę w strumieniu jednokierunkowym skierowanym ku powierzchni, jego cząstki pozostają na filtrze tworząc narastającą warstwę tzw. „placек filtracyjny” (ang. *cake*). W układzie krzyżowo-prądowym, dzięki stycznemu przepływowi surowca nad membraną, nawarstwianie się cząstek na powierzchni membrany jest ograniczone, dzięki czemu można osiągnąć wyższy średni strumień podczas procesu.



Rys. 6. Filtracja w przepływie a) jednokierunkowym (ang. *dead-end*) i b) krzyżowo-prądowym (ang. *cross-flow*).

Głównymi parametrami oceniającymi przechodzenie substancji separowanej przez membranę są: strumień permeatu i współczynnik zatrzymania.

Objęściowy strumień permeatu wyraża wzór (1):

$$J_v = \frac{V}{tA} \quad (1)$$

gdzie:  $J_v$  – objęściowy strumień permeatu,  $V$  – objętość permeatu,  
 $t$  – czas,  $A$  – powierzchnia membrany.

Współczynnik zatrzymania wyraża wzór (2):

$$R = 1 - \frac{c_p}{c_r} \quad (2)$$

gdzie:  $R$  – współczynnik zatrzymania substancji,  $c_p$  – stężenie substancji w permeacie,  $c_r$  – stężenie substancji w retencji.

Strumień permeatu dla czystej wody zależy liniowo od ciśnienia transmembranowego, co można opisać wzorem (3):

$$J = \frac{\Delta P_{tr}}{R_m} \quad (3)$$

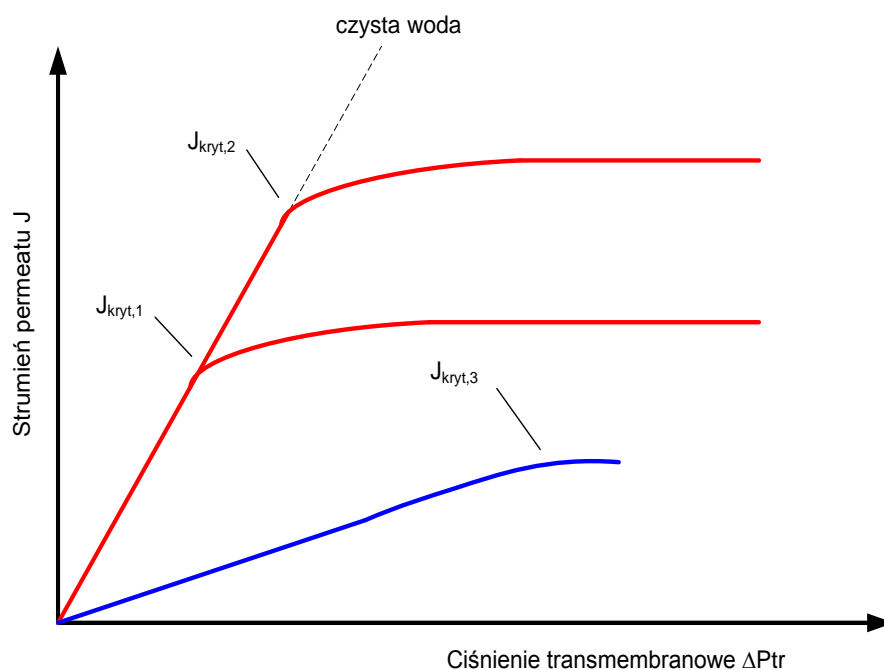
gdzie:  $\Delta P_{tr}$  – ciśnienie transmembranowe,  $R_m$  – opór membrany.

Podczas prowadzenia procesów membranowych obserwuje się spadek strumienia permeatu w czasie. Jest on związany z takimi zjawiskami jak polaryzacja stężeniowa i blokowanie membran, które towarzyszą separacji i mogą powodować dodatkowe opory transportu. Zjawisko polaryzacji stężeniowej powoduje utworzenie przy powierzchni membrany warstewki zawiesiny o stężeniu przewyższającym średnie stężenie separowanej substancji. Efektem polaryzacji stężeniowej jest spadek szybkości procesu oraz zmiany własności separacyjnych membrany. Mocno zagęszczona zawiesina może tworzyć przy powierzchni membrany warstwę placka filtracyjnego ( $R_w$ ), który stanowi duży opór dla transportu. Gdy rozpuszczalność w warstwie polaryzacyjnej jest przekroczone, roztwór podlega żelowaniu ( $R_{zel}$ ) i tworzy wtórną membranę, która stanowi kolejny opór wobec transportowanych składników. Z punktu widzenia wydajności procesu ( $R_f$ ) zjawiskiem wysoce niekorzystnym jest również blokowanie membran (ang. *fouling*). Polega ono na odkładaniu się substancji (cząstek zawieszonych, koloidów, rozpuszczalnych związków wielkocząsteczkowych, soli) na powierzchni membrany i/lub w jej porach, co powoduje ograniczenie jej przepuszczalności. Najbardziej podatne na *fouling* są membrany porowate, a więc głównie ultrafiltracyjne i mikrofiltracyjne. *Fouling* może mieć charakter odwracalny bądź nieodwracalny. Jeżeli można przywrócić membranę początkową wydajność to mówi się o *foulingu* odwracalnym. Wszystkie opisane wyżej opory powodują znaczny spadek strumienia permeatu co przedstawia równanie (4):

$$J = \frac{\Delta P_{tr}}{R_m + R_w + R_{zel} + R_f} \quad (4)$$

Polaryzacji stężeniowej często towarzyszy uniezależnienie się strumienia permeatu od siły napędowej procesu (Rys. 7 - linie czerwone). W ciśnieniowych procesach membranowych strumień permeatu ustala się na stałym poziomie w warunkach wysokiego ciśnienia i stężenia, ale niskiej prędkości retentatu. W przypadku niskich ciśnień transmembranowych, strumień zależy liniowo od ciśnienia transmembranowego (wzór 3), gdyż w takich warunkach dominuje jedynie opór membrany. Po przekroczeniu pewnej wartości ciśnienia transmembranowego, strumień permeatu przestaje wzrastać liniowo i ustala się na stałym poziomie. Wtedy

to opory warstewki ( $R_w$ ), których wielkość jest uzależniona od wielkości ciśnienia transmembranowego, oraz inne dodatkowe opory (równanie 4) dominują nad oporami membrany ( $R_m$ ). W takiej sytuacji zwiększanie ciśnienia nie powoduje wzrostu strumienia, jedynie zwiększa koszty procesu separacji. Sterowanie grubością warstewki placka filtracyjnego przez dobór parametrów hydrodynamicznych umożliwia osiągnięcie optymalnej wydajności procesu. Według teorii strumienia krytycznego [119, 120, 121] siły działające na cząstki w sąsiedztwie membrany mogą pozostawać w stanie równowagi z siłami unoszenia ku membranie. Dzięki temu w pewnych warunkach (poniżej strumienia o wartości krytycznej) nie tworzy się placki filtracyjny a nad membraną przemieszcza się jedynie warstewka polaryzacyjna zawiesiny o zwiększonym stężeniu. Brak dodatkowych oporów warstwy przymembranowej powoduje, że strumień permeatu jest stały i ma wartość strumienia dla czystej wody. W takich warunkach proces jest stabilny w czasie i nie obserwuje się spadku strumienia, w wyniku czego proces separacji przebiega z wysoką wydajnością.



Rys. 7. Strumień krytyczny i jego rodzaje – sposoby wyznaczania.

Wartość strumienia krytycznego wyznacza się graficznie (Rys. 7). Jest on strumieniem, który ze wzrostem przyłożonego ciśnienia transmembranowego, odrywa się od linii czystej wody (silna forma strumienia krytycznego, linie czerwone, strumienie 1 i 2) lub staje się nieliniowy (słaba forma, linia niebieska, strumień 3) [121].



Wielkość strumienia krytycznego zależy od kształtu i wielkości separowanych cząstek, prędkości przepływu zawiesiny, stężenia zawiesiny oraz konfiguracji modułu membranowego.

Separacja membranowa umożliwia skuteczne oddzielenie mikroorganizmów z mieszaniny, co umożliwia otrzymanie sterylnego płynu pochodzącego. Dobierając właściwy rodzaj membrany można zapewnić koncentrowanie się zawiesiny tylko na jej powierzchni, zapobiegając blokowaniu się porów. Kontrola grubości warstewki płacka filtracyjnego umożliwia dobór odpowiednich warunków hydrodynamicznych tak, by proces był wydajny.

## 2.6. ROLA SURFAKTANTÓW W BIODEGRADACJI

Surfaktanty mogą oddziaływać zarówno pozytywnie jak i negatywnie na proces biodegradacji związków hydrofobowych [122], a mogą również w ogóle nie wpływać na ten proces. Zależy to od charakteru chemicznego surfaktantów i zanieczyszczeń oraz od fizjologii mikroorganizmów. Niejonowe surfaktanty stymulują, podczas gdy jonowe hamują biodegradację [123]. Pozytywne oddziaływanie surfaktantów spowodowane jest wzrostem rozpuszczalności hydrofobowych związków w wodzie, co powoduje podział między hydrofobowe rdzenie micel, poprawia transport masy zanieczyszczeń z gleby do fazy wodnej i zwiększa biodostępność tych związków dla rozkładających je mikroorganizmów [124, 125]. Ponadto surfaktanty powodują wzrost hydrofobowości błony komórkowej [126] co promuje większą powierzchnię kontaktu pomiędzy węglowodorem i komórką bakterii [127]. Modyfikacja powierzchni ściany komórkowej może być realizowana poprzez adsorpcję surfaktantu na komórce bakterii lub poprzez zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej. Hydrofobowość powierzchni komórek szerokiego zakresu mikroorganizmów przypisywana jest obecności białek i tłuszczów w ścianie komórkowej. Dodatek związków powierzchniowo czynnych prawdopodobnie prowadzi do fenotypowych zmian w powierzchni mikroorganizmów podczas wzrostu. Tak więc hydrofobowość komórki bakteryjnej, będąca wynikiem powinowactwa komórek do zanieczyszczeń ropopochodnych, w obecności surfaktantów może ulec zmianie. W przypadku bakterii szybko rozkładających związki ropopochodne wzrost stopnia biodegradacji związany jest ze spadkiem hydrofobowości. Na stałej powierzchni przy pewnym stężeniu tzw. krytycznym stężeniu admicelarnym

CAC surfaktanty adsorbują się na powierzchni w postaci jedno lub dwuwarstwowych agregatów. Natomiast w roztworach wodnych surfaktanty występują w postaci monomeru, a kiedy stężenie surfaktantu osiągnie wartość równą CMC zaczynają tworzyć się micelle. W hydrofobowym rdzeniu micel dochodzi do solubilizowania związków nierozpuszczalnych w wodzie [128], co umożliwia komórkom asymilację tych substancji w postaci zemulgowanych małych kropeł [129]. Głównym parametrem wpływającym na skuteczność surfaktantów w usuwaniu węglowodorów jest stężenie i struktura surfaktantu i węglowodoru, ale również pH i siła jonowa, które mogą zmieniać konfigurację surfaktantowych agregatów [130]. Biodegradacja WWA w obecności surfaktantów rzadko przebiega ze zwiększoną skutecznością. Przy stężeniu surfaktantu poniżej CMC nie ma żadnego efektu, a przy stężeniu równym lub wyższym od CMC obserwuje się zahamowanie mineralizacji, co sugeruje, że substrat wewnątrz micel nie jest biodostępny. W literaturze znajdują się też doniesienia na temat pozytywnego wpływu surfaktantów na biodegradację węglowodorów np. Triton X-100 i Brij 30 w stężeniu powyżej CMC stymulują degradację naftalenu [95].

Negatywne efekty stosowania surfaktantów mogą wynikać z toksyczności surfaktantu, który wpływa na zwiększenie przepuszczalności lub powoduje lizę błony komórkowej poprzez oddziaływanie z lipidowymi składnikami lub w wyniku reakcji cząsteczek surfaktantu z białkami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania komórki. Toksyczność surfaktantów zależy od ich charakteru jonowego. Wydaje się, że niejonowe surfaktanty są najmniej mikrobiologicznie aktywne. W przypadku biodegradacji fenantrenu toksyczność rośnie w następujący sposób: surfaktanty niejonowe < surfaktanty anionowe < surfaktanty kationowe. W przypadku surfaktantów o podobnej strukturze i zawierających takie same części hydrofilowe ich toksyczność zależy od długości łańcucha i maleje wraz ze wzrostem jego długości [131]. Surfaktanty mogą wpływać hamująco na proces biodegradacji węglowodorów z powodu wzrostu toksyczności zanieczyszczeń. Spowodowane jest to głównie występowaniem zanieczyszczeń w fazie wodnej w zwiększonym stężeniu, jak również efektem maskowania tzn. niedostępności węglowodorów obecnych w micelach. Surfaktanty mogą też utrudniać adhezję komórek do hydrofobowych substratów i zmniejszać dostępność zsolubilizowanego węglowodoru. W niektórych przypadkach surfaktant działa jak bariera utrudniająca bezpośredni kontakt między komórką i substancją

organiczną [132, 133]. Preferencyjna degradacja surfaktantów również może być przyczyną ich negatywnego wpływu na biodegradację związków hydrofobowych. Efekt negatywny w tym przypadku może być spowodowany przez:

- wyczerpanie składników mineralnych i tlenu,
- toksyczność produktów pośrednich, które często są bardziej toksyczne niż produkt wyjściowy,
- preferencyjną degradację surfaktantu spowalniająca degradację zanieczyszczeń.

Degradacja surfaktantów ma również swoje zalety, m.in. usunięcie surfaktantu z zanieczyszczonego terenu [134]. Surfaktant wykorzystywany przez mikroorganizmy w charakterze substratu pokarmowego powoduje przyrost biomasy, skutkiem czego jest wzrost stopnia usunięcia zanieczyszczeń. Ponadto obecność ulegającego rozkładowi surfaktantu może zwiększać pobieranie węglowodorów przez drobnoustroje wykorzystujące następujące mechanizmy:

- emulgowanie węglowodorów; surfaktanty obniżając napięcie powierzchniowe umożliwiają powstanie makro- lub mikroemulsji, w wyniku czego zwiększa się powierzchnia kontaktu i transport masowy węglowodorów do fazy wodnej ulega poprawie,
- zwiększenie rozpuszczalności zwane solubilizacją, spowodowane obecnością micel. Hydrofobowe związki organiczne są rozpuszczane wewnątrz rdzeni micel, podczas gdy bardziej hydrofilowe cząsteczki takie jak jednopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą być obecne zarówno w rdzeniu jak i w warstwie zewnętrznej micel,
- ułatwiony transport zanieczyszczeń dzięki oddziaływaniom między cząsteczkami związków zanieczyszczających i pojedynczymi cząsteczkami surfaktantów lub micelami.

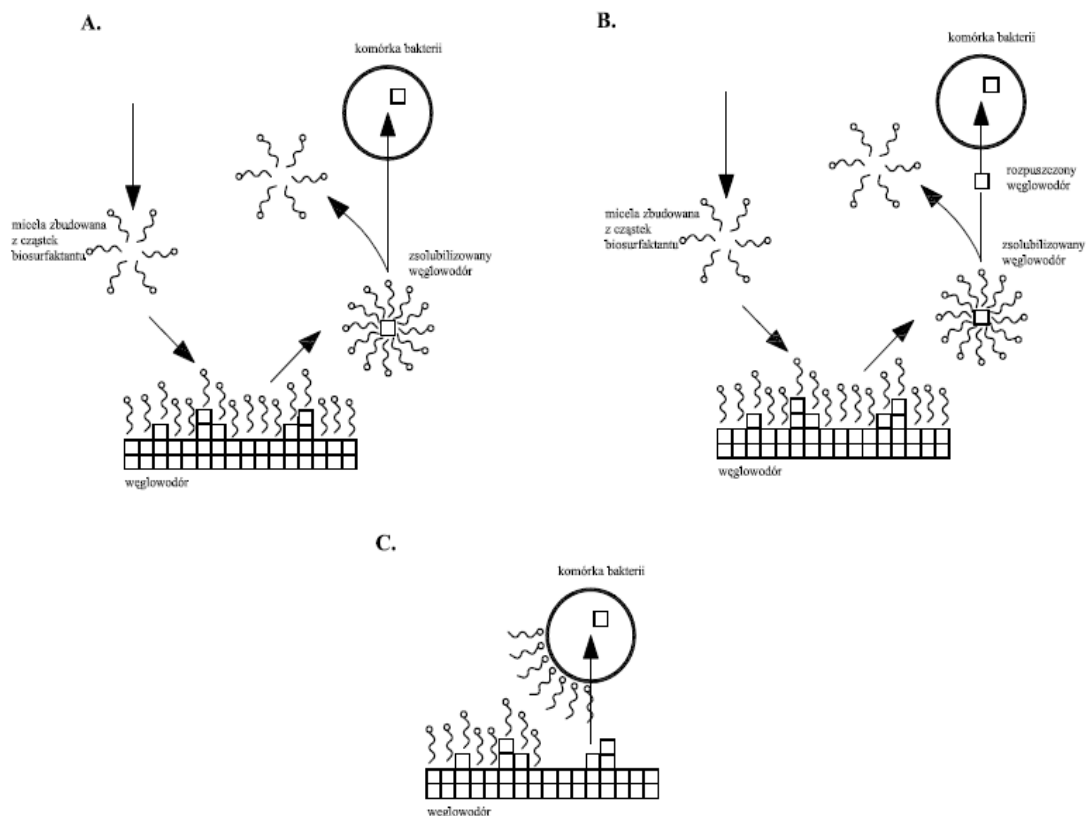
Te trzy mechanizmy poprawiają transport masowy węglowodorów, lecz są trudne do rozróżnienia [135].

Naturalne związki powierzchniowo czynne również ułatwiają pobieranie zanieczyszczeń naftowych przez drobnoustroje [136]. Biosurfaktanty występują jako

substancje wewnątrzkomórkowe, zewnątrzkomórkowe i zlokalizowane na powierzchni komórki. Te obecne na powierzchni komórki zwiększają hydrofobowość komórek ułatwiając przyłączanie się węglowodorów, w wyniku czego następuje pasywny transport do wnętrza komórki, niewymagający żadnej energii ani specjalnych składników błony. Ponadto ograniczają zwilżanie powierzchni komórek, co powoduje wzrost powierzchni bezpośredniego kontaktu węglowodoru z komórką na granicy faz woda/węglowodór. Z kolei biosurfaktanty wydzielane na zewnątrz komórki powodują pseudosolubilizację umożliwiając pobieranie zdyspergowanych węglowodorów przez komórki, które nie mają hydrofobowych powierzchni komórek. Wzrost mikroorganizmów wykorzystujących węglowodory w charakterze źródła węgla i energii jest możliwy tylko na granicy faz węglowodór/woda, ponieważ oksygenazy biorące udział w metabolizowaniu węglowodorów nigdy nie są wydzielane na zewnątrz, lecz są zawsze związane z błoną komórkową [137]. Mikroorganizmy wykształciły kilka mechanizmów ułatwiających im pobieranie substancji hydrofobowych. Volkering [135] uważa, że drobnoustroje pobierają ciekłe węglowodory przez:

- pobieranie zsolubilizowanych węglowodorów,
- pobieranie węglowodorów rozpuszczonych w fazie wodnej,
- bezpośrednio pobieranie węglowodorów z granicy faz ciecz/ciecz.

Pierwszy mechanizm umożliwia bakteriom pobieranie węglowodorów z rdzeni micel przez połączenie z błoną komórkową (Rys. 8a). Drugi mechanizm dotyczy związków o stosunkowo wysokiej rozpuszczalności w wodzie. Rolą biosurfaktantu jest w tym przypadku zwiększenie transportu masowego węglowodoru do fazy wodnej (Rys. 8b). Natomiast bezpośrednio pobieranie węglowodorów z granicy faz ciecz/ciecz wymaga przyłączenia komórek bakterii do substratu, w którym kluczową rolę odgrywa hydrofobowość powierzchni komórki i wytwarzanie związanych ze ścianą komórkową biosurfaktantów (Rys. 8c).



Rys. 8. Mechanizmy ułatwiające mikroorganizmom pobieranie węglowodorów [132].

Wg Cameotry [138] mechanizmy ułatwiające pobieranie hydrofobowych związków przez drobnoustroje to:

- bezpośredni kontakt komórek z dużymi kroplami węglowodorów,
- oddziaływania komórek z zsolubilizowanymi węglowodorami występującymi w postaci kropeł o rozmiarach komórek (wzrost dyspersji ułatwia kontakt w celu pobrania węglowodoru),
- pobieranie węglowodoru wraz z otaczającym go surfaktantem.

Rola surfaktantu polega na zwiększeniu dostępności węglowodorów poprzez zwiększenie solubilizacji, ale na tym się nie kończy. Wydaje się, że węglowodór zamknięty w miceli surfaktantu jest formą, w której komórka pobiera węglowodór. Energia potrzebna na pobranie węglowodoru dzielona jest pomiędzy proces pinocytozy oraz proces przeniesienia surfaktantu bez węglowodoru z wnętrza komórki na zewnątrz. Pobrany biosurfaktant może być również wykorzystany w celu utworzenia błony wokół pobranego węglowodoru w celu podzielenia go na mniejsze cząsteczki i zwiększenia

powierzchni metabolizowania. Pełen proces pobierania węglowodorów jest połączeniem mechanizmu pobierania przez bezpośredni kontakt oraz pseudosolubilizacji węglowodorów do mikrokropel. Oba mechanizmy są ułatwione przez biosurfaktanty i występują jednocześnie w celu zwiększenia i ułatwienia pobierania węglowodorów.

Przykładem pozytywnego oddziaływania biosurfaktantów na biodegradację zanieczyszczeń naftowych jest zwiększenie skuteczności biodegradacji alkanów w obecności ramnolipidów, soforozolipidów i fosfolipidów. Dodatek ramnolipidu w stężeniu powyżej CMC powoduje wzrost biodegradacji heksadekanu, oktadekanu, krezotu i innych mieszanin węglowodorów w glebie oraz promuje biodegradację osadów petrochemicznych [95]. Niemniej jednak biosurfaktanty mogą również hamować biodegradację. Inhibicja może być spowodowana specyfiką rodzaju mikroorganizmów lub substratu. Na przykład soforozolipidy stymulują biodegradację węglowodorów u rodzaju *Torulopsis*, zaś u innych rodzajów hamują. Natomiast w przypadku inhibicji spowodowanej specyfiką substratu biosurfaktanty otrzymane z glukozy lub oleju roślinnego hamują biodegradację węglowodorów ropopochodnych, podczas gdy biosurfaktanty otrzymane z węglowodorów ropopochodnych nie powodują hamowania ich biodegradacji [139]. Większość mikroorganizmów produkuje mieszaniny biosurfaktantów o podobnej strukturze, ale o różnych właściwościach fizykochemicznych. Na przykład rodzaj *Torulopsis* produkuje soforozolipidy w formie kwasów lub laktonów, a *Arthrobacter paraffineus* może produkować zarówno trehalozolipidy i sukrozolipidy w zależności od substratu węglowego użytego w pożywce. Struktura biosurfaktantów może w różny sposób wpływać na metabolizm węglowodorów, na przykład laktonowe formy soforozolipidów hamują rozkład heksadekanu, podczas gdy formy kwasowe powodują stymulację tego procesu. Wpływ surfaktantu na biodegradację węglowodorów zależy od struktury surfaktantu, stanu fizycznego substratu, stopnia dyspersji i emulgowania węglowodoru oraz od rodzaju szczepu degradującego. Na przykład oktadekan będący węglowodorem stałym jest degradowany szybciej bez dodatku biosurfaktantu niż heksadekan będący węglowodorem ciekłym, ale w obecności biosurfaktantu sytuacja ulega zmianie i wtedy heksadekan jest rozkładany szybciej niż oktadekan. Jest to związane z większym wzrostem dyspersji ciekłego węglowodoru niż stałego w obecności biosurfaktantu

[140]. Na biodegradację z użyciem biosurfaktantów wpływa również pH ponieważ oddziałuje ono na morfologię mikroorganizmów jak i biosurfaktantów. Np. morfologia ramnolipidów jest funkcją pH i zmienia się od lamelarniej przez pęcherzykową do micelarniej wraz ze wzrostem pH. Struktura w jakiej występuje biosurfaktant wpływa na dyspersję organicznych związków. Wpływ ramnolipidów na biodegradację hydrofobowych substancji zależy od rodzaju szczepu i rodzaju zanieczyszczenia, np. ramnolipid hamuje biodegradację fenantrenu przez szczepy *Sphingomonas* sp. i *Paenibacillus* sp., jednak mechanizmy odpowiedzialne za taki efekt są różne dla obu szczepów. W przypadku szczepu *Sphingomonas* sp. działanie hamujące biodegradację spowodowane jest toksycznym oddziaływaniem ramnolipidu na ten szczep, natomiast w przypadku szczepu *Paenibacillus* sp., dla którego ramnolipid nie jest toksyczny inhibicja biodegradacji może wynikać z toksyczności zemulgowanego fenantrenu lub ze wzrostu toksyczności ramnolipidu w obecności fenantrenu [141]. Testy toksyczności wykazują, że obecność zsolubilizowanego fenantrenu powoduje wzrost toksyczności surfaktantu 100-krotnie [95]. Dodatek ramnolipidu w stężeniu 6mM stymuluje biodegradację oktadekanu przez szczepy wolno degradujące, natomiast ta sama ilość biosurfaktantu w przypadku mikroorganizmów szybko degradujących nie wpływa na biodegradację. Obecność ramnolipidu w stężeniu 0,6 mM hamuje biodegradację oktadekanu zarówno przez wolno jak i szybko rozkładające drobnoustroje na min. 100 godzin. Po tym czasie stopień biodegradacji wzrasta i jest porównywalny do kontroli. Kiedy bakterie hodowane są tylko na oktadekanie (bez dodatku ramnolipidu) to hydrofobowość komórek szybko degradujących jest większa niż wolno degradujących. Natomiast kiedy substratem jest oktadekan w obecności ramnolipidu hydrofobowość komórek bakterii wolno degradujących wzrasta dramatycznie, podczas gdy dla bakterii szybko degradujących pozostaje bez zmian. Ponadto wzrost ten występuje tylko wtedy, gdy substratem jest związek słabo rozpuszczalny w wodzie np. heksadekan lub oktadekan [95]. Biosurfaktanty mogą zwiększać dyspersję słabo rozpuszczalnych organicznych związków na dwa sposoby; po pierwsze – zmniejszając napięcie powierzchniowe i międzyfazowe podłoża hodowlanego, zwiększając tym samym dyspersję związków organicznych na poziomie molekularnym, po drugie – fizyczne oddziaływania biosurfaktantu z cząsteczkami słabo rozpuszczalnych związków organicznych zwiększają ich dyspersję – wzrost rozproszenia poniżej CMC

spowodowany jest hydrofobowymi oddziaływaniami pomiędzy monomerami biosurfaktantu i cząsteczkami słabo rozpuszczalnych związków organicznych, natomiast wzrost rozproszenia powyżej CMC jest wywołany „kapsułkowaniem” cząsteczek tych związków wewnątrz micel lub dwuwarstwowych agregatów.

Stosowanie biosurfaktantów jest atrakcyjne ze względu na to, iż są to produkty naturalne, biodegradowalne i potencjalnie mogą być używane w remediacji *in situ*. Niemniej jednak nie da się przewidzieć zachowania konkretnego biosurfaktantu bez przeprowadzenia badań laboratoryjnych, ponieważ wpływ biosurfaktantów na proces biodegradacji zależy od wielu czynników, takich jak: rodzaj zanieczyszczenia, rodzaj mikroorganizmu czy rodzaj biosurfaktantu.



### 3. CEL I ZAKRES PRACY

Celem badań było określenie wpływu ramnolipidu otrzymanego ze szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI na biodegradację frakcji destylacyjnych ropy naftowej wraz z opracowaniem warunków procesu otrzymywania tego biosurfaktantu ze szczególnym uwzględnieniem etapu izolacji i oczyszczania.

Zakres badań:

- izolacja z gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi szczepu *Pseudomonas aeruginosa* wytwarzającego biosurfaktant (ramnolipid),
- oznaczenie przynależności taksonomicznej wyizolowanego szczepu,
- ocena zdolności wytwarzania biosurfaktantu przez wyizolowany szczep,
- otrzymanie ramnolipidu z zastosowaniem innowacyjnych metod izolacji i oczyszczania,
- określenie właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych wyizolowanego ramnolipidu
- zbadanie wpływu ramnolipidu na proces biodegradacji frakcji destylacyjnych ropy naftowej
- ustalenie warunków (stężenia ramnolipidu, stężenia i rodzaju substratu, pH, temperatury, natleniania, rodzaju mikroorganizmów), w których obserwuje się stymulujący wpływ ramnolipidu na biodegradację frakcji ropy naftowej.

## 4. MATERIAŁY

### 4.1. PODŁOŻA MIKROBIOLOGICZNE

#### **Roztwór fizjologiczny**

NaCl	8,5 g
woda destylowana	1000 cm <sup>3</sup>

NaCl rozpuszczono w wodzie destylowanej, rozlano do probówek po 9 cm<sup>3</sup> i sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

#### **Agar odżywczy**

pepton	4 g
wyciąg mięsny	0,4 g
enzymatyczny hydrolizat kazeiny	5,4 g
hydrolizat drożdży	1,7 g
NaCl	3,5 g
agar	10 g
woda destylowana	1000 cm <sup>3</sup>

Składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej i sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

#### **Bulion odżywczy**

wyciąg mięsny	3 g
pepton	10 g
NaCl	5 g
woda destylowana	1000 cm <sup>3</sup>

Składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej i sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

**Podłoże Śińskiej-Trocenka**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,56 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2,13 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
woda destylowana	1000 $\text{cm}^3$
mikroelementy	1 $\text{cm}^3$

Składniki rozpuszczono wg wymienionej kolejności w wodzie destylowanej i sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

**Mikroelementy:**

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,7 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,1 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,005 g
woda destylowana	1000 $\text{cm}^3$

**Agar z TTC**

wyciąg mięsny	3 g
pepton	10 g
$\text{NaCl}$	5 g
agar	3,5 g
woda destylowana	1000 $\text{cm}^3$

1% roztwór chlorku 2,3,5-trifenylotetrazoliowego (TTC)	5 cm <sup>3</sup>
--	-------------------

Wyciąg mięsny, pepton, NaCl i agar rozpuszczono w wodzie destylowanej i sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 20 minut. Do wysterylizowanego podłoża dodano 1% roztwór TTC przygotowany w sterylnej wodzie destylowanej.

#### **Podłoże płynne ze wskaźnikiem Andrade**

woda peptonowa 10%	100 cm <sup>3</sup>
glukoza	5 g
wskaźnik Andrade	10 cm <sup>3</sup>
woda destylowana	900 cm <sup>3</sup>

Do wody destylowanej dodano wodę peptonową, doprowadzono pH do 7,1-7,3, dodano wskaźnik Andrade (po dodaniu pH powinno wynosić 7,5) i glukozę. Po rozpuszczeniu glukozy podłoże rozlano do probówek z rurkami Dürhama i sterylizowano w temperaturze 110 °C przez 30 minut.

#### **Woda peptonowa 10%**

pepton	100 g
NaCl	50 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,74 g
woda destylowana	1000 cm <sup>3</sup>

Składniki rozpuszczono w wodzie destylowanej i sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

#### **Wskaźnik Andrade**

fuksyna kwaśna	0,2 g
woda destylowana	100 cm <sup>3</sup>

Fuksynę rozpuszczono w wodzie destylowanej i doprowadzono pH do 6,8-7,2 przy użyciu 1M NaOH. Wskaźnik Andrade w środowisku kwaśnym zmienia barwę na czerwoną.

#### **Podłoże Hugh-Leifson**

pepton	2 g
NaCl	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
glukoza	10 g
agar	3 g
błękit bromotymolowy 0,4%	7,5 cm <sup>3</sup>
roztwór alkoholowy	
woda destylowana	1000 cm <sup>3</sup>

Rozpuszczono składniki ogrzewając na koszu grzejnym, doprowadzono pH do 7,3, dodano wskaźnik i rozlano do probówek. Sterylizowano w temperaturze 110 °C przez 30 minut.

#### **Podłoże wg Wei**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,44 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,68 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,24 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,14 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,0088 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0011 g
EDTA	0,0012 g
Woda destylowana	1000 ml
Glicerol	20 g

Składniki rozpuszczono wg wymienionej kolejności w wodzie destylowanej i sterylizowano w temperaturze 121 °C przez 20 minut.

**Agar z krwia**

Płytki 90 mm firmy GRASO BIOTECH

## 4.2. BARWNIKI

**Fiolet krystaliczny**

fiolet krystaliczny	10 g
96% alkohol etylowy	100 cm <sup>3</sup>

**Fuksyna fenolowa wg Ziehla****Roztwór A**

fuksyna zasadowa	0,3 g
96% alkohol etylowy	30 cm <sup>3</sup>

**Roztwór B**

5% roztwór wodny fenolu	100 cm <sup>3</sup>
----------------------------	---------------------

Zmieszano roztwory A i B.

**Błękit metylenowy wg Löfflera****Roztwór A**

błękit metylenowy	0,3 g
96% alkohol etylowy	30 cm <sup>3</sup>

**Roztwór B**

0,01% roztwór KOH	100 cm <sup>3</sup>
-------------------	---------------------

Zmieszano roztwory A i B.

## 4.3. ODCZYNNIKI

**Płyn Lugola**

jod	1 g
KI	2 g

woda destylowana 300 cm<sup>3</sup>

### **Alkohol etylowy**

M = 46,07 g/mol, d = 0,81 g/cm<sup>3</sup>, bezbarwna ciecz o charakterystycznym zapachu, POCh CZDA zawartość min. 96%

### **Alkohol metylowy**

M = 32,04 g/mol, d = 0,79 g/cm<sup>3</sup>, bezbarwna ciecz o charakterystycznym zapachu, POCh CZDA zawartość min. 99,8%

### **Nadtlenek wodoru**

M = 34,02 g/mol d = 1,11 g/cm<sup>3</sup>, bezbarwna ciecz o lekko ostrym zapachu, POCh CZDA zawartość 30%

### **Chlorowodorek tetrametylo-p-fenylodiaminy**

M = 237,17 g/mol, biała krystaliczna substancja o lekkim zapachu, FLUKA CZ

### **Kwas siarkowy**

M = 98,08 g/mol, d = 1,84 g/cm<sup>3</sup>, bezbarwna ciecz bez zapachu, POCh CZDA zawartość min. 95%

### **Kwas solny**

M = 36,46 g/mol, d = 1,19 g/cm<sup>3</sup>, bezbarwna ciecz o ostrym zapachu, POCh CZDA zawartość 35- 38%

### **Orcyna**

M = 124,14 g/mol, krystaliczna substancja o barwie zbliżonej do białej, ALDRICH

### **Dichlorometan**

M = 84,93 g/mol, d = 1,32 g/cm<sup>3</sup>, bezbarwna ciecz o słodkawym zapachu, POCh CZDA

### **Chlorek sodu**

M = 58,44 g/mol, d = 2,16 g/cm<sup>3</sup>, bezbarwna krystaliczna substancja, POCh CZDA

**Smar silikonowy**

$d = 1,1 \text{ g/cm}^3$ , biała pasta bez zapachu, POCh

**4.4. INNE****olej LOTOS 10W40**

bursztynowa oleista ciecz o charakterystycznym zapachu, LOTOS OIL S.A.

**Ropa naftowa „URAL”**

$d = 0,861 \text{ g/cm}^3$ , gęsta brunatna oleista ciecz o charakterystycznym zapachu, Zakłady Rafineryjne Polskiego Koncernu Naftowego „ORLEN” S.A. Płock

Wyżej wymienione substancje stosowano w badaniach dotyczących wykrywania zdolności bakterii do wytwarzania biosurfaktantów [4].

**4.5. ROPA NAFTOWA I JEJ FRAKCJE**

Przedmiotem badań była otrzymana z Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie polska podkarpacka ropa naftowa GROBLA oraz jej frakcje destylacyjne: frakcja olejowa o temperaturze wrzenia 180-350°C oraz frakcja ciężka o temperaturze wrzenia powyżej 350°C. Ropa naftowa GROBLA nie zawiera zanieczyszczeń siarkowych i charakteryzuje się poniższymi właściwościami:

Gęstość w 20°C, $\text{kg/m}^3$	805
Lepkość w 20°C, $\text{mm}^2/\text{s}$	3,19
Liczba kwasowa, mg KOH/g	0,16
Zawartość siarki, % m/m	0,73
Skład grupowy, % m/m:	
węglowodory nasycone	70,9
aromaty	18,3
żywice	8,5
asfalteny	2,3
Wskaźnik nasycone/aromaty	3,9
% n-alkanów	4,9
Początek destylacji, °C	67



## 4.6. BAKTERIE

Do produkcji biosurfaktantów użyto szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI wyizolowanego wcześniej z gleby zanieczyszczonej związkami naftowymi. Jest to pałeczka gram ujemna naturalnie występująca w glebie, posiadająca zdolność wykorzystywania węglowodorów w charakterze źródła węgla i energii, produkująca ramnolipidy.

W badaniach nad stymulacją procesu biodegradacji produktów naftowych wykorzystano następujące szczepy bakterii: *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* i *Rhodococcus erythropolis*. Zastosowano te szczepy w dwóch wariantach: szczepy adaptowane do rozkładu węglowodorów pochodzące z kolekcji Zakładu Biologii i Ekologii Politechniki Wrocławskiej oraz szczepy nieadaptowane do rozkładu węglowodorów zakupione z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Państwowej Akademii Nauk we Wrocławiu.

## 5. METODYKA BADAŃ

### 5.1. SPOSÓB OZNACZANIA PRZYNALEŻNOŚCI

#### TAKSONOMICZNEJ BAKTERII *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BI

W celu określenia przynależności taksonomicznej wyizolowanego z gleby szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI wykonano barwienie Grama, test API ID 32 GN oraz testy określające następujące cechy:

- ruchliwość,
- aktywność katalazową,
- aktywność oksydazową,
- wytwarzanie kwasu z glukozy,
- sposób metabolizowania glukozy (utlenianie czy fermentacja),

#### 5.1.1. BARWIENIE METODĄ GRAMA

Przygotowany preparat utrwalony zalano fioletem krystalicznym na 1,5 min, a następnie spłukano wodą i zalano płynem Lugola na 1,5 min. Kolejnym krokiem było dokładne spłukanie preparatu 96% alkoholem aż do momentu odbarwienia, jednak nie dłużej niż przez 30 sekund, wypłukanie alkoholu wodą i zalanie preparatu fuksyną fenolową wg Ziehla na 30 sekund. Ostatnim etapem było wypłukanie preparatu wodą i osuszenie bibułą. Barwienie metodą Grama pozwala określić kształt komórki oraz różnicuje bakterie na gram dodatnie i gram ujemne w zależności od budowy ściany komórkowej. Bakterie gram dodatnie mają grubą ścianę komórkową z dużą zawartością mureiny (peptydoglikan) i barwią się na niebiesko, a bakterie gram ujemne mają cienką ścianę komórkową z małą zawartością mureiny i barwią się na czerwono [142].

#### 5.1.2. OCENA RUCHLIWOŚCI BAKTERII NA PODŁOŻU PÓLPŁYNNYM Z TTC

Probówki zawierające półpłynny agar odżywczy z chlorkiem 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowym (TTC) w postaci słupka zaszczepiono świeżą zawiesiną

bakterii przygotowaną w roztworze fizjologicznym z 24-godzinnej hodowli na skosie agarowym. Inokulację wykonano poprzez wkłucie w podłoże igłą preparacyjną na głębokość ok. 5 cm. Tak zaszczipione próbki inkubowano w temperaturze 22 °C i codziennie przez 7 dni obserwowano rezultaty. Pojawienie się czerwonej barwy w całej objętości pożywki świadczy o ruchliwości bakterii, natomiast pojawienie się czerwonej barwy tylko w linii wkłucia oznacza brak zdolności bakterii do poruszania się. Czerwona barwa powstaje w wyniku redukcji bezbarwnego TTC do czerwonego formazanu[143].

### 5.1.3. MIKROSKOPOWA OCENA RUCHLIWOŚCI BAKTERII W KROPLI WISZĄCEJ

Do przygotowania preparatu przyżyciowego użyto szkiełka podstawowego z „łezką”. Na szkiełko podstawowe wokół „łezki” naniesiono 4 niewielkie krople smaru silikonowego. Na szkiełku nakrywkowym umieszczono kroplę zawiesiny bakterii w roztworze fizjologicznym przygotowanej z 24-godzinnej hodowli na skosie agarowym. Szkiełko nakrywkowe położono delikatnie na szkiełku podstawowym tak, aby smar silikonowy znajdował się w rogach szkiełka nakrywkowego. Smar silikonowy utrzymuje szkiełko nakrywkowe tak by wisząca kropla zawiesiny nie dotykała szkiełka podstawowego [143]. Przygotowany preparat oglądano pod mikroskopem.

### 5.1.4. WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI KATALAZOWEJ

Katalaza jest enzymem metabolicznym, który rozkłada toksyczny dla bakterii nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) do wody i tlenu. Zdolność wytwarzania katalazy ma większość bakterii tlenowych i względnie beztlenowych oraz niektóre bakterie beztlenowe. Test na wykrycie katalazy przeprowadzono się na szkiełku podstawowym. W umieszczonej na szkiełku kropli 3% wody utlenionej zawieszono bakterie z 24-godzinnej hodowli na skosie agarowym. Pojawienie się pęcherzyków tlenu świadczy o wyniku dodatnim czyli o wytwarzaniu katalazy przez badane mikroorganizmy [143].

### 5.1.5. WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI OKSYDAZOWEJ

Oksydaza cytochromowa jest enzymem oddechowym, który przenosi elektrony z układu cytochromowego na tlen cząsteczkowy. Oksydaza przekazując elektrony bierze udział w powstaniu cząsteczki wody [144, 145]. Test na wyrzucie oksydazy cytochromowej wykonano poprzez wykonanie rozmazu z 24-godzinnej hodowli na skosie agarowym na pasku bibuły za pomocą szklanej bagietki. Na rozmaz naniesiono kroplę 1% wodnego roztworu chlorowodoru tetrametylo-p-fenylodiaminy [143]. Pojawienie się granatowej barwy w ciągu 1 minuty świadczy o wyniku dodatnim, czyli o wytwarzaniu oksydazy cytochromowej. Granatowa barwa pochodzi od powstającego błękitu indolofenolowego.

### 5.1.6. WYKRYWANIE KWASU Z GLUKOZY

Wytwarzanie kwasu z glukozy zbadano na podłożu płynnym z odczynnikiem Andrade. Probówki z podłożem zaszczerpiono 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny bakterii w roztworze fizjologicznym przygotowanej z 24-godzinnej hodowli na skosie agarowym. Inkubację prowadzono w temperaturze 22 °C przez 7 dni, codziennie sprawdzając czy w probówkach pojawia się kwas lub kwas i gaz. O obecności kwasu świadczy zmiana barwy podłoża ze słomkowej na różową, natomiast powstający gaz zbiera się w rurkach Dürhama [146].

### 5.1.7. TEST O – F

Test wykonano na podłożu Hugh –Leifson w postaci słupków. Bezpośrednio przed użyciem podłoże zregenerowano w celu usunięcia rozpuszczonego tlenu. Regenerację prowadzono poprzez gotowanie probówek z podłożem przez 20 minut po czym podłoże szybko schłodzono. Dwie probówki z tak przygotowanym podłożem zaszczerpiono poprzez wklucie igły preparacyjnej z zawiesiną bakterii w roztworze fizjologicznym przygotowaną z 24-godzinnej hodowli na skosie agarowym. Jedną probówkę zalano ciekłą parafiną tak by utworzyła się warstwa o grubości ok. 1 cm. W probówce z parafiną panują warunki beztlenowe, a w probówce bez parafiny tlenowe. Probówki inkubowano przez 14 dni codziennie obserwując rezultaty. Zmiana barwy podłoża z zielonej na żółtą w probówce bez parafiny i brak zmian w podłożu w probówce z parafiną świadczą o utlenianiu glukozy. Zmiana barwy podłoża z zielonej

na żółtą w obu probówkach świadczą o fermentacji glukozy. Brak zmian barwy podłoża w obu probówkach lub wystąpienie barwy niebieskiej w próbówce bez parafiny świadczą o braku rozkładu glukozy [146].

## 5.2. OZNACZANIE ZDOLNOŚCI BAKTERII *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DO WYTWARZANIA BIOSURFAKTANTÓW

### 5.2.1. WYKRYWANIE AKTYWNOŚCI HEMOLITYCZNEJ

Szczep posiano na podłoże agarowe z krwią i inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 37 °C. Pojawienie się jasnych stref wokół kolonii spowodowanych hemolizą świadczy o produkcji biosurfaktantów. Średnica jasnych stref jest ściśle związana ze stężeniem biosurfaktantu. Jednak w niniejszych badaniach użyto tej metody jedynie w sensie jakościowym, czyli rozpatrywano czy badany szczep bakterii produkuje biosurfaktanty czy nie produkuje [147].

### 5.2.2. METODA „*DROP-COLLAPSE*”

Test metodą „*drop-collapse*” wykonano w polistyrenowych płytkach typu Biolog z 96-mikrostudzienkami. Każda płytka posiadała przykrywkę. Przed użyciem płytki zostały wypłukane trzy razy gorącą wodą, etanolem i wodą destylowaną, po czym zostały wysuszone i zdezynfekowane pod promieniowaniem UV. Po takim przygotowaniu do każdej studzienki w płytce dodano 2 µl oleju LOTOS 10W40 i odstawiono na 24 godziny w celu równomiernego pokrycia dna studzienek cienką warstwą oleju. Na powierzchnię oleju naniesiono 5 µl hodowli płynnej bakterii *Pseudomonas aeruginosa* i obserwowano kształt kropli po 1 minucie [148, 149, 150]. Jeśli kropla nie zmieniła kształtu to wynik uznawano za ujemny, natomiast jeśli kropla uległa spłaszczeniu i powiększyła znacznie swą średnicę lub całkowicie się rozmyła to wynik uznawano za dodatni. Analizowano 15 kropel.

### 5.2.3. METODA „*OIL-SPREADING*”

Do szalki Petriego o średnicy 10 cm nalano 20 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Następnie na powierzchnię wody naniesiono bardzo ostrożnie 20 µl surowej ropy naftowej, która utworzyła cieniutką warstewkę. Na warstewkę ropy naniesiono 10 µl

płynnej hodowli bakterii *Pseudomonas aeruginosa* [151]. Jeśli na powierzchni ropy powstała jasna strefa w miejscu naniesienia hodowli bakterii to wynik uznawano za dodatni, natomiast jeśli nie pojawiła się jasna strefa to wynik uznawano za ujemny.

#### 5.2.4. POMIAR NAPIĘCIA POWIERZCHNIOWEGO

Napięcie powierzchniowe mierzono tensjometrem STA-1 niemieckiej firmy SINTERFACE metodą Du Nouy (odrywania pierścienia) [152], która polega na tym, że zanurza się w badanej cieczy cienki platynowy pierścień tak, aby został całkowicie zwilżony. Następnie powoli wyjmuje się pierścień z badanej cieczy mierząc przy tym siłę potrzebną do oderwania pierścienia od powierzchni cieczy. Wartość tej siły opisuje poniższy wzór:

$$\gamma = \frac{F_{max}}{4\pi Rf}$$

$R$  – promień platynowego pierścienia

$f$  – poprawka będąca funkcją geometrii pierścienia i gęstością badanej cieczy

### 5.3. METODYKA OTRZYMYWANIA RAMNOLIPIDÓW

Do produkcji biosurfaktantów użyto szczepu *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowanego z gleby skażonej produktami naftowymi. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* wytwarzają ramnolipidy, anionowe biosurfaktanty z grupy glikolipidów. Przygotowano inokulum zaszczepiając 50 cm<sup>3</sup> podłoża H z glicerolem (2%) eżką pełną bakterii ze skosu agarowego. Inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 22 lub 30 °C. Po 24 godz. zaszczepiono właściwe hodowle przygotowanym inokulum w ilości 2%. Hodowlę prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 1000 cm<sup>3</sup> zawierających 500 cm<sup>3</sup> podłoża. Badano produkcję biosurfaktantów na podłożu mineralnym wg Śińskiej-Trocenka (podłoże H) zawierającym jako substrat glicerol w ilości: 1%, 2%, 3% i 4% oraz na podłożu wg Wei. Hodowle inkubowano w temperaturze 22 i 30 °C przez 11 dni wytrząsając na wytrząsarce z prędkością 130 obr/min. Co drugi dzień badano przyrost biomasy metodą filtrów membranowych oraz wyznaczając OD<sub>600</sub>, przyrost biosurfaktantu metodą kolorymetryczną oraz napięcie powierzchniowe metodą odrywania pierścienia.

### 5.3.1. METODYKA OZNACZANIA BIOMASY

Do oznaczenia ilości biomasy zastosowano metodę wagową z wykorzystaniem filtrów membranowych oraz pomiar gęstości optycznej. Gęstość optyczną hodowli mierzono przy długości fali  $\lambda=600$  nm na spektrofotometrze SHIMADZU UV-1601. Otrzymane wartości absorbancji przeliczano na ilość biomasy w g/l wg krzywej wzorcowej sporządzonej metodą wagową z wykorzystaniem filtrów membranowych oraz na ilość bakterii wyrażoną w jtk/ml (jtk-jednostki tworzące kolonie) wg krzywej wzorcowej wyznaczonej metodą płytkową Kocha stosując posiew głębinowy zawiesin o określonym  $OD_{600}$  na podłoże agarowe odżywcze. W metodzie wagowej wykorzystano polistyrenowy zestaw do filtracji o pojemności  $250\text{ cm}^3$  firmy NALGENE oraz nylonowe filtry membranowe firmy Whatman o wielkości porów  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ . Filtry membranowe przed zastosowaniem zważono.  $5\text{ cm}^3$  hodowli przesączono pod próżnią po czym filtr membranowy wysuszono w suszarce w temperaturze  $40\text{ }^\circ\text{C}$  przez 24 godziny i odstawiono do eksykatora. Po 24 godz. filtr zważono i obliczono biomasę [153].

### 5.3.2. METODYKA OZNACZANIA STĘŻENIA RAMNOLIPIDU

Do oznaczenia stężenia ramnolipidu wykorzystano metodę kolorymetryczną. W metodzie tej ramnolipid ulega hydrolizie w obecności stężonego kwasu siarkowego. Otrzymana po hydrolizie ramnoza reaguje z orcyną tworząc barwny związek. Ilość ramnozy lub ramnolipidu można oznaczyć spektrofotometrycznie i odczytać z krzywej wzorcowej. W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej sporządzono roztwory ramnolipidu o stężeniach: 0, 500, 1000, 1500 i 2000 mg/l. Do probówek wiano po  $0,4\text{ cm}^3$  roztworów ramnolipidu o w/w stężeniach i dodano po 3,4 ml odczynnika reakcyjnego. Probówki wstawiono do łaźni wodnej o  $T=80\text{ }^\circ\text{C}$  na 15 min. Po ostudzeniu przez 5 min w łaźni wodnej o temperaturze  $18\text{ }^\circ\text{C}$  zmierzono absorbancję przy  $\lambda=505$  nm wobec ślepej próby. W ten sam sposób oznaczono zawartość ramnolipidu w próbce badanej [154].

## 5.4. METODYKA ODDZIELANIA BAKTERII OD PODŁOŻA POHODOWLANEGO

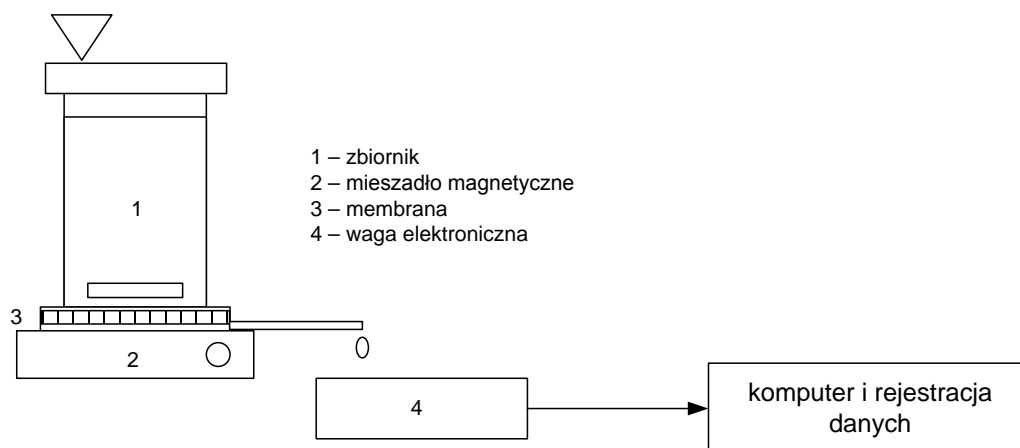
Do oddzielenia mikroorganizmów od podłoża pohodowlanego zastosowano techniki membranowe ponieważ wirowanie w wirówce laboratoryjnej nie pozwalało na całkowite usunięcie bakterii z roztworu, co powodowało zanieczyszczenie produktu komórkami bakterii.

### 5.4.1. SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE JEDNOKIERUNKOWYM

W celu ustalenia warunków procesu badanie nad separacją mikroorganizmów prowadzono w małej skali w komórce filtracyjnej o pojemności 200 cm<sup>3</sup> z wbudowanym mieszadłem magnetycznym (Rys. 9). Separację mikroorganizmów prowadzono z zastosowaniem dwóch membran: mikrofiltracyjnej o wielkości porów 0,1 μm oraz ultrafiltracyjnej o MWCO 100 kDa. Obie membrany wykonane były z polichlorku winylu (PVC) i posiadały powierzchnię permeacji 28,7 cm<sup>2</sup>. Określono wpływ ciśnienia, stężenia biomasy oraz mieszania na strumień permeatu. Ciśnienie badano w zakresie 1-2 bara, stężenie biomasy w zakresie 1-4 g/l, prędkość mieszania 0 lub 250 obr/min. Przepływ przez membranę określano zbierając permeat w odpowiednich okresach czasu. Zważone próbki permeatu przeliczano na objętość uwzględniając gęstość cieczy. Strumień permeatu obliczano z poniższego wzoru:

$$\text{strumień} \left( \text{LMH lub } \frac{l}{m^2h} \right) = \frac{\text{przepływ przez membranę} \left( \frac{cm^3}{min} \right)}{\text{powierzchnia permeacji} (cm^2)} \times 600$$

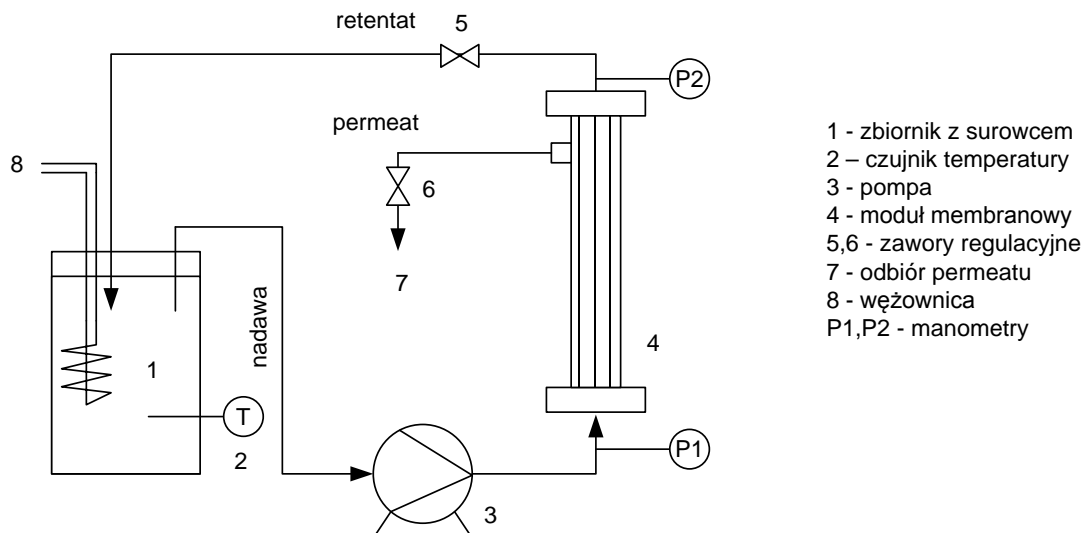




Rys. 9. Schemat komórki filtracyjnej pracującej w układzie jednokierunkowym.

#### 5.4.2. SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE KRZYŻOWO-PRĄDOWYM

Mikroorganizmy separowano w instalacji AMICON SP20 (Rys. 10). Eksperyment wykonano w Zakładzie Inżynierii Chemicznej i Procesowej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Przed separacją hodowle mikroorganizmów poddano sterylizacji w temperaturze 121 °C, pod ciśnieniem 2 atmosfer w czasie 20 minut aby uniknąć zainfekowania instalacji. Mikroorganizmy separowano na membranie kapilarnej z polisulfonu (PS) o powierzchni permeacji 4507 cm<sup>2</sup> i MWCO 100 kDa. Zbadano wpływ ciśnienia na strumień permeatu przy stałym stężeniu biomasy i różnych prędkościach przepływu oraz wpływ ciśnienia na strumień permeatu przy stałej prędkości i różnych stężeniach biomasy. Wpływ ciśnienia badano w zakresie 0-0,7 barów, stężenia biomasy w zakresie 1-4 g/l, a prędkości przepływu w zakresie 0,5-1,5 m/s.



Rys. 10. Schemat instalacji AMICON SP 20.

## 5.5. METODYKA PRZYGOTOWANIA I REGENERACJI MEMBRAN

Zarówno przed jak i po każdym eksperymencie myto membrany w celu usunięcia z ich powierzchni warstewki mikroorganizmów oraz składników płynu pochodowlanego. Najpierw membrany przemywano wielokrotnie wodą destylowaną a następnie kwasem solnym o stężeniu 0,1M przez 30 minut i wodorotlenkiem sodu o stężeniu 0,1M przez 30 minut. Na koniec jeszcze raz membrany myto kilkakrotnie wodą destylowaną aż do uzyskania wartości strumienia różniącej się maksymalnie o 5% od wartości strumienia sprzed eksperymentu. Przed przystąpieniem do każdego nowego eksperymentu sprawdzano czystość membrany, mierząc strumień wody destylowanej.

## 5.6. METODYKA IZOLACJI RAMNOLIPIDÓW

Po oddzieleniu bakterii podłoże pochodowlane zakwaszono 1M HCl do pH=2 i odstawiono na 24 godz. do lodówki w celu wytrącenia kryształów ramnolipidu. Obniżenie pH powoduje, że ramnolipid przechodzi w formę kwasową, która jest nierozpuszczalna w wodzie [114]. Biosurfaktanty przy niskim pH wypadają z roztworu w postaci osadu, dzięki czemu można je oddzielić od podłoża pochodowlanego. Po 24 godz. oddzielano ramnolipid od roztworu poprzez wirowanie z prędkością 9000 obr/min przez 30 min. Następnie uzyskany osad suszono w suszarce w temp. 40 °C przez 24

godz. Tak otrzymany ramnolipid wykorzystano w badaniach biodegradacji produktów naftowych.

## 5.7. METODYKA OCZYSZCZANIA RAMNOLIPIDÓW

### 5.7.1. ETAP I – ZATRZYMANIE PRZEZ MEMBRANĘ RAMNOLIPIDU

#### I BIAŁEK

Etap I miał na celu zatrzymanie przez membranę dużych cząsteczek czyli ramnolipidu oraz białek, natomiast małe cząsteczki zostały usunięte wraz ze strumieniem permeatu przez pory w membranie. Zatem w pierwszym etapie została zmniejszona objętość podłoża pohodowlanego oraz oczyszczono ramnolipid z małych cząsteczek takich jak glicerol i substancje mineralne. Po tym etapie w retentacie został tylko ramnolipid i białka. W celu dobrania odpowiednich warunków proces prowadzono na małych objętościach płynu pohodowlanego w komórce ultrafiltracyjnej o pojemności 50 cm<sup>3</sup> wyposażonej w mieszadło magnetyczne. W przeprowadzonych badaniach dobrano membranę o odpowiednim dla ramnolipidu MWCO, zbadano wpływ ciśnienia (100-160 kPa) na strumień permeatu, określono wpływ stężenia ramnolipidu (0,75-3 g/l) oraz pH podłoża pohodowlanego (5-10) na stopień zatrzymania.

### 5.7.2. ETAP II – ROZCIEŃCZENIE RETENTATU ALKOHOLEM

#### I ZATRZYMANIE PRZEZ MEMBRANĘ BIAŁEK

Drugi etap polegał na oddzieleniu białek od ramnolipidu. W tym celu otrzymany po pierwszym etapie retentat rozcieńczono alkoholem. Alkohol powoduje zniszczenie micel, dzięki czemu otrzymuje się ramnolipid w postaci pojedynczych cząstek, ponadto powoduje łączenie się białek w ogromne agregaty o średnicy 100 nm. Dzięki dużej różnicy w wielkości cząsteczek można oddzielić ramnolipid od białek zatrzymując białka w retentacie[153]. Proces ultrafiltracji prowadzono w komórce ultrafiltracyjnej o pojemności 50 cm<sup>3</sup> wyposażonej w mieszadło magnetyczne. Powierzchnia permeacji wynosiła 13,4 cm<sup>2</sup>.

## 5.8. ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA LC-MS SKŁADU OTRZYMANEGO BIOSURFAKTANTU

W badaniach użyto systemu Summit x2 (Dionex), składającego się z modułu rozpuszczalnikowego z degazerem membranowym SOR-100, pompy P680, autosamplera ASI-100, detektora ELSD Chromachem (Esa Inc.) i spektrometru masowego LCQ Advantage MAX (Thermo Electron Corporation), pracującego w trybie ESI-. Źródłem azotu do detektora ELSD i jako gazu kurtynowego do detektora MS był generator Mistral (Schmidlin) dostarczający 11 l/min gazu o ciśnieniu 8.2 bar i czystości 99.8%. System pracował pod kontrolą oprogramowania Chromeleon, wersja 6.7 SP3 Build 1884. W badaniach użyto następujących kolumn C18: Zorbax SB 300A, 3,5 mm, 150 x 4.6 mm (Agilent); Chromolith 100 x 4,6 mm (Merck). Stosowano wodę o przewodnictwie właściwym poniżej 0.06 mS/m, acetonitryl "HPLC grade" (POCh) i kwas octowy cz.d.a. (POCh).

## 5.9. BADANIA BIOLOGICZNYCH WŁAŚCIWOŚCI RAMNOLIPIDU

Toksyczność oznaczono przy pomocy testu z bakteriami luminescencyjnymi *Vibrio fischeri* wg standardowej procedury podanej przez producenta. Do odczytu luminescencji wykorzystano analizator M 500, a do obliczeń wyników program MicrotoxOmni. Wyniki toksyczności podano w postaci wartości EC50 czyli takiego stężenia, które powoduje 50% reakcji testowej (przeżyciowej).

Cytotoksyczność badano na jednowarstwowej hodowli ludzkich nabłonkopodobnych komórek raka płuc – A549 (American Type Culture Collection, Cell Culture Line – ATCC CCL185). Hodowle komórek A549 prowadzono w płynie hodowlanym Dulbecco [155]. Cytotoksyczność wodnych roztworów ramnolipidu badano metodą kontaktu bezpośredniego w warunkach *in vitro*. Stopień cytotoksyczności poszczególnych roztworów ramnolipidu określano w odwróconym mikroskopie. Minimalne stężenie, które powodowało degenerację 50% komórek uznano za dawkę toksyczną (TCCD<sub>50</sub> – Tissue Culture Cytotoxic Dose) [156, 157].

## 5.10. METODYKA BADAŃ NAD STYMULACJĄ BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH

Badania nad stymulacją biodegradacji produktów naftowych prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 100 cm<sup>3</sup>. Kolby zawierały poszczególne frakcje destylacyjne podkarpackiej ropy naftowej GROBLA w charakterze substratu (frakcja olejowa i frakcja ciężka), podłoże mineralne oraz kulturę bakterii. Całkowita objętość hodowli wynosiła 30 cm<sup>3</sup>. Do hodowli zastosowano podłoże mineralne Śiśkiniej-Trocenka. Kultura bakterii degradująca węglowodory składała się z 3 szczepów: *Rhodococcus erythropolis*, *Acinetobacter calcoaceticus* i *Pseudomonas putida*. Szczepy bakterii pochodziły z kolekcji Zakładu Biologii i Ekologii Politechniki Wrocławskiej i charakteryzowały się zdolnością do degradacji produktów naftowych [158]. Hodowle zaszczepiano 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny bakterii w podłożu H o OD<sub>600</sub> = 0,8. Substrat dodawano w stężeniach 0,1; 0,5; 1; 1,5 i 2%. Hodowle prowadzono w temperaturze 15, 20, 25 i 30 °C przez 14 dni z wytrząsaniem 80 i 140 obr/min oraz bez wytrząsania. Hodowle prowadzono z dodatkiem i bez dodatku ramnolipidu. Ramnolipid dodawano w stężeniach 40, 80, 120 i 160 mg/l. Po inkubacji z hodowli ekstrahowano pozostałość substratu i oznaczano procent jego redukcji w procesie biodegradacji. Wszystkie eksperymenty wykonano w 3 powtórzeniach a wyniki w rozdziale 6.7 przedstawiono jako średnią z 3 powtórzeń.

## 5.11. ANALIZA PRZEBIEGU PROCESU BIODEGRADACJI

Eksperyment prowadzono w bioreaktorze BIOSTAT Aplus firmy Sartorius o pojemności roboczej 0,4-5l. Bioreaktor zawierał 3l podłoża mineralnego Śiśkiniej-Trocenka, które zaszczepiono zawiesiną bakterii *Rhodococcus erythropolis* w ilości 10%. Substratem była ciężka frakcja ropy naftowej, którą dodano w stężeniu 0,1%. Hodowlę prowadzono w temperaturze 20°C przez 14 dni. Zawartość reaktora mieszano z prędkością 50 obr/min w celu natleniania. Hodowlę prowadzono z dodatkiem ramnolipidu (40 mg/l) oraz bez ramnolipidu. W pobranych próbkach oznaczano napięcie powierzchniowe, ogólną liczbę bakterii oraz liczbę i wielkość kropeł ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej.

## 5.12. METODYKA OKREŚLANIA LICZBY I WIELKOŚCI KROPEL CIĘŻKIEJ FRAKCJI DESTYLACYJNEJ ROPY NAFTOWEJ

Do określenia liczby i wielkości kropeł ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej zastosowano komorę Fuchsa-Rosenthala oraz mikroskop Olympus CX41 z aparatem cyfrowym Olympus SC30 podłączonym do komputera. Wielkość kropeł podano w postaci ich średnicy, a ilość kropeł ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej w postaci ich liczby w 1 cm<sup>3</sup>.

## 5.13. PRZEBIEG PROCESU EKSTRAKCJI POZOSTAŁYCH PO BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH

Do izolacji pozostałości węglowodorów po procesie zastosowano metodę ekstrakcji rozpuszczalnikiem. W roli rozpuszczalnika zastosowano dichlorometan. Ekstrakcję prowadzono w probówkach wirówkowych typu falcon o pojemności 50 cm<sup>3</sup>. Po przelaniu zawartości kolb Erlenmayera do każdej próbówki wirówkowej dodano 10 cm<sup>3</sup> dichlorometanu, niewielką ilość NaCl i 0,2 cm<sup>3</sup> 1M HCl w celu szybszego złamania emulsji, czyli jej rozwarstwienia na fazę organiczną i fazę wodną. Następnie całość wytrząsano przez 3 min w celu zwiększenia transportu węglowodorów z fazy wodnej do fazy organicznej. W celu szybkiego rozdzielenia obu faz próbówki wirowano przez 10 min z prędkością 8000 obr/min w wirówce MPW-350R firmy MPW-Med. Instruments. Fazę organiczną przeniesiono do zważonych szklanych fiolek i odstawiono na 48 godz. do odparowania rozpuszczalnika.

## 5.14. ANALIZA ILOŚCIOWA WĘGLOWODORÓW

Stopień biodegradacji węglowodorów oznaczano metodą wagową. Fiolki z ekstraktami zważono na wadze analitycznej SBC 31 firmy SCALTEC Instruments i obliczono ubytek substratu.

## 5.15. ANALIZA GC-MS

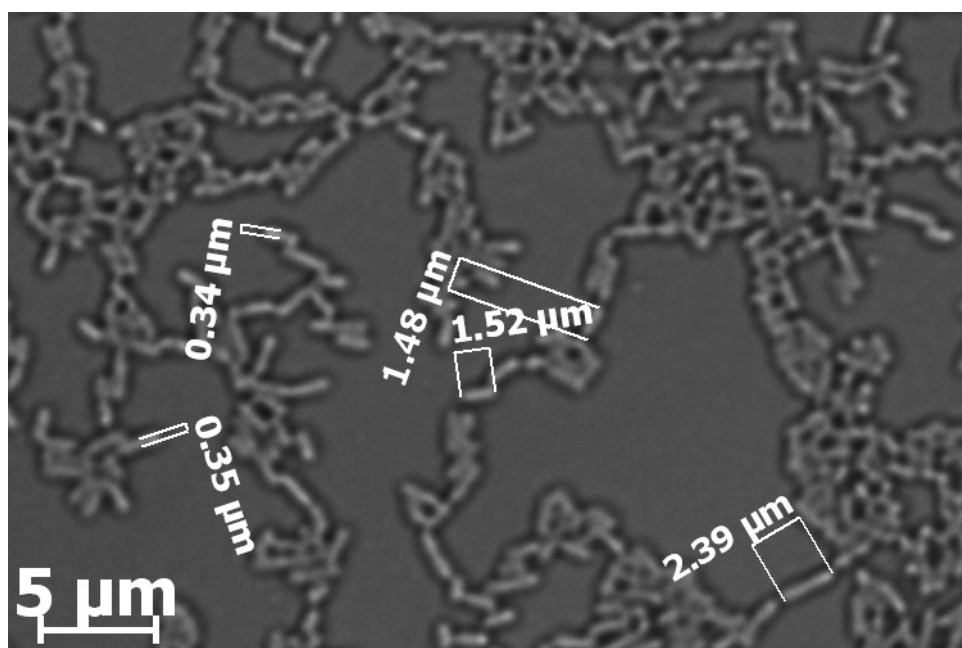
Technika chromatografii gazowej posłużyła do analizy jakościowej próbek ropy naftowej, frakcji destylacyjnych ropy naftowej oraz ekstraktów po procesie biodegradacji. Analizę GC-MS wykonano na aparacie Hewlett-Packard ser. II GC 6890

wyposażonym w detektor MS HP 5973 i kolumnę kapilarną HP-1701 (30m x 0,25 mm x 0,25 $\mu$ m). Fazą stacjonarną był 14%-cyjanopropylofenylo-86%-dimetylosiloksan. Jako gazu nośnego użyto helu o czystości 99,999%. Temperatura kolumny była programowana w zakresie: 40-3/10/250-10min. Próbki dozowano z zastosowaniem trybu split (1:5). Spektrometr mas pracował w trybie jonizacji elektronowej (70eV) i skanowania jonów m/z 29-350. Zarejestrowano chromatogramy: TIC i wybranych jonów fragmentacyjnych.

## 6. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

### 6.1. CHARAKTERYSTYKA SZCZEPU PRODUKUJĄCEGO RAMNOLIPIDY

Bakterie wytwarzające biosurfaktant wyizolowano ze środowiska gruntowo-wodnego. Do izolacji zastosowano podłoże mineralne H z olejem napędowym jako jedynym źródłem węgla. Wyizolowany szczep miał zdolność wzrostu na agarze odżywczym w warunkach tlenowych. Pod względem morfologicznym były to formy cylindryczne, barwiące się ujemnie metodą Grama. Wyniki badań diagnostycznych (Tab. 5) pozwoliły na zakwalifikowanie szczepu do gatunku *Pseudomonas aeruginosa* (Rys. 11).



Rys. 11. Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* widziane w powiększeniu mikroskopu optycznego (powiększenie ok. 2000x).



Tab. 5. Cechy diagnostyczne badanego szczepu *Pseudomonas* BI.

<b>Badana cecha</b>	<b>Wynik</b>	<b>Badana cecha</b>	<b>Wynik</b>
Barwienie Grama	–	Asymilacja glikogenu	–
Kształt komórek	podłużny	Asymilacja kwasu 3-hydroksybenzoowego	–
Wzrost na powietrzu	+	Asymilacja L-seryny	–
Ruchliwość	+	Asymilacja D-mannitolu	+
Wytwarzanie katalazy	+	Asymilacja D-glukozy	+
Wytwarzanie oksydazy	+	Asymilacja salicyny	–
Wytwarzanie kwasu z glukozy	+	Asymilacja D-melibiozy	–
Test O-F	O	Asymilacja L-fukozy	–
Asymilacja L-ramnozy	–	Asymilacja D-sorbitolu	–
Asymilacja N-acetylo-glukozaminy	+	Asymilacja L-arabinozy	–
Asymilacja D-rybozy	–	Asymilacja kwasu propionowego	+
Asymilacja inozytolu	–	Asymilacja kwasu dekanowego	+
Asymilacja D-sacharozy	–	Asymilacja kwasu walerianowego	+
Asymilacja D-maltozy	–	Asymilacja cytrynianu trisodowego	+
Asymilacja kwasu suberynowego	–	Asymilacja L-histydyny	+
Asymilacja octanu sodu	+	Asymilacja 2-ketoglukonianu potasu	+
Asymilacja kwasu mlekowego	+	Asymilacja kwasu 3-hydroksymasłowego	+
Asymilacja L-alaniny	+	Asymilacja kwasu 4-hydroksybenzoowego	+
Asymilacja 5-ketoglukonianu potasu	–	Asymilacja L-proliny	+

+ = wynik pozytywny, - = wynik negatywny, O = utlenianie

## 6.2. ANALIZA ZDOLNOŚCI SZCZEPU *PSEUDOMONAS*

### *AERUGINOSA* DO WYTWARZANIA BIOSURFAKTANTÓW

Biosurfaktanty produkowane przez bakterie mogą mieć charakter wewnętrzny, kiedy stanowią część ściany komórkowej lub zewnętrzny, kiedy są wytwarzane na zewnątrz komórki. Charakter biosurfaktantu ma znaczenie w przypadku dobierania metod mających na celu wykrycie biosurfaktantu. Biosurfaktanty produkowane na zewnątrz komórki obniżają znacząco napięcie powierzchniowe podłoża hodowlanego i można je wykryć poprzez pomiar napięcia powierzchniowego. Natomiast te biosurfaktanty, które są wbudowane w ścianę komórkową bakterii nie obniżają

wyraźnie napięcia powierzchniowego, ale powodują np. hemolizę czyli rozpad czerwonych krwinek w hodowlach na podłożu z krwią. Z tych właśnie powodów do określenia zdolności wyizolowanego szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI do produkowania biosurfaktantów zastosowano kilka różnych metod: pomiar napięcia powierzchniowego płynnej hodowli bakterii, metodę „*drop-collapse*” opartą na zwilżaniu hydrofobowej powierzchni, metodę „*oil-spreading*” polegającą na pojawianiu się, w obecności surfaktantów, jasnych stref na warstewce ropy naftowej naniesionej na powierzchnię wody oraz hodowlę na podłożu z krwią sprawdzającą aktywność hemolityczną. Wykorzystane metody pozwalają zarówno na określenie czy dana bakteria wytwarza biosurfaktant, jak również w jakim stężeniu, ponieważ widnieje ścisły związek pomiędzy stopniem zwilżalności powierzchni, średnicą jasnych stref na warstewce ropy naftowej i średnicą jasnych stref na podłożu z krwią a stężeniem biosurfaktantu. W niniejszej pracy wymienione metody zastosowano w charakterze jakościowym a nie ilościowym i posłużyły jedynie do potwierdzenia zdolności szczepu *P. aeruginosa* BI do wytwarzania biosurfaktantów. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli (Tab. 6).

Tab. 6. Wyniki testów wykrywających produkcję biosurfaktantów.

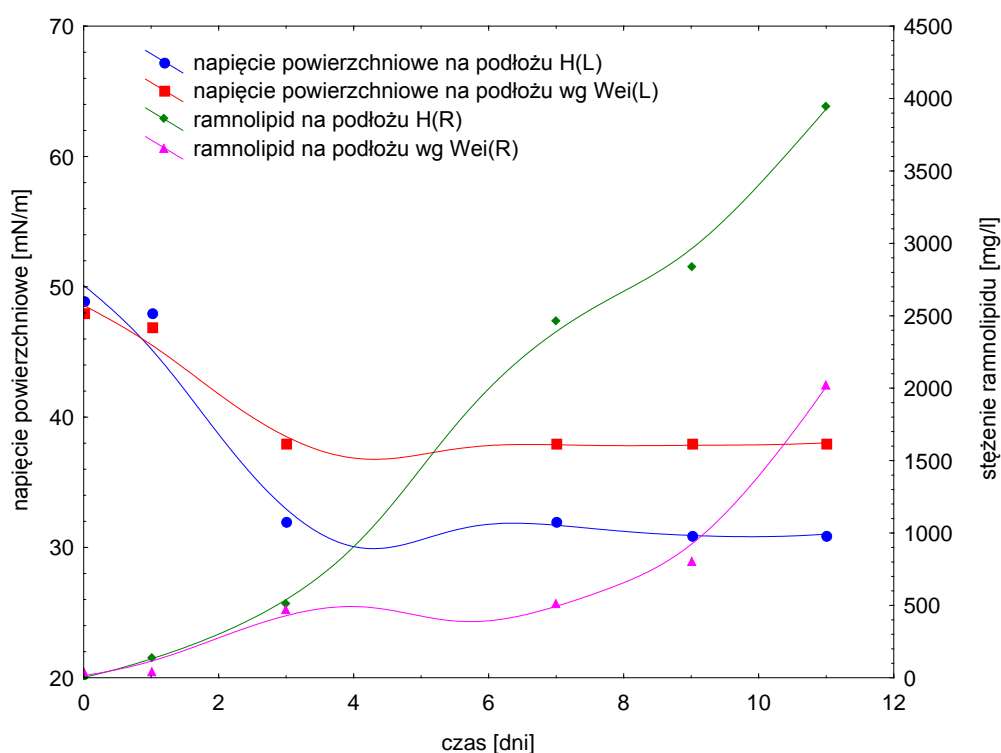
Metoda	Wynik
„ <i>drop-collapse</i> ”	+
„ <i>oil-spreading</i> ”	+
badanie aktywności hemolitycznej	+
pomiar napięcia powierzchniowego	30 mN/m

### 6.3. PRODUKCJA BIOSURFAKTANTÓW

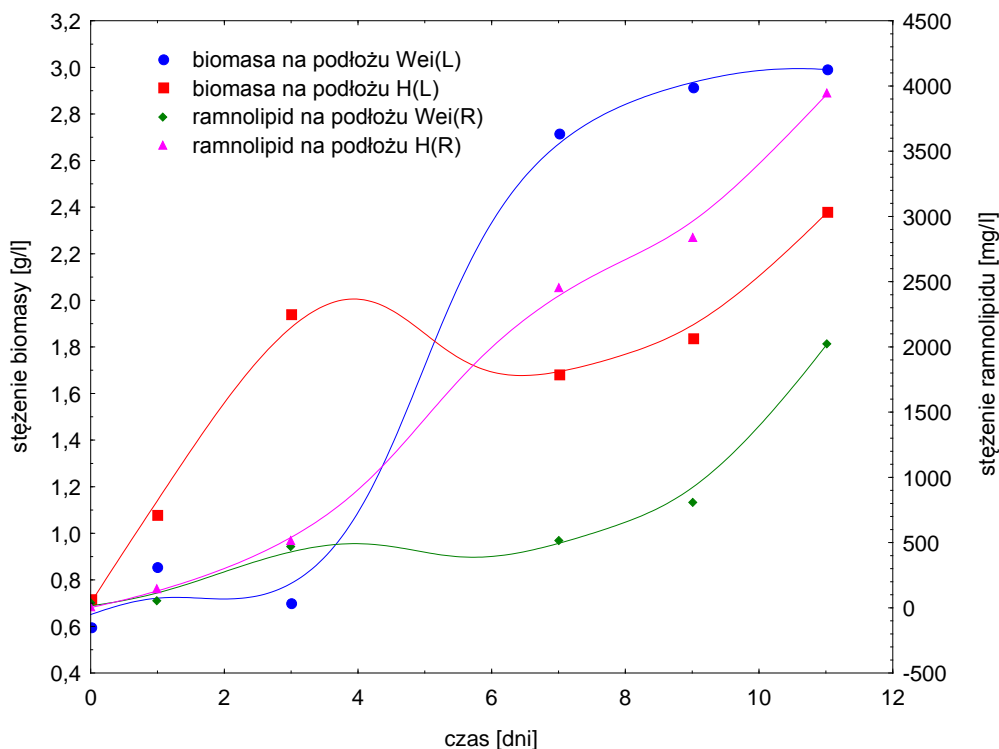
Tradycyjnie do produkcji biosurfaktantów i bioemulsyfikatorów używa się węglowodorów. Zakłada się, że produkcja biosurfaktantów umożliwia komórkom dostęp do hydrofobowego substratu. Niemniej jednak do produkcji biosurfaktantów można stosować substraty rozpuszczalne w wodzie, są one tańsze i bardziej preferowane ze względu na to iż hodowla jednofazowa jest łatwiejsza od dwufazowej. Ponadto substraty węglowodorowe są nieakceptowane w przypadku takich zastosowań biosurfaktantów jak w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy farmaceutycznym

[159]. Ramnolipidy mogą być produkowane z różnych źródeł węgla zarówno hydrofobowych takich jak węglowodory [160, 161, 162], oleje roślinne [163], odpady z rafinacji olejów roślinnych [164, 165, 166] jak i hydrofilowych takich jak glicerol, mannitol, melasa, glukoza, fruktoza [60]. Pomimo, że substraty nierozpuszczalne w wodzie dają wyraźny wzrost wydajności produkcji, to często obserwuje się zmniejszenie stopnia produkcji z powodu słabej rozpuszczalności substratu. Ponadto inną znaczącą wadą stosowania jako substratu substancji hydrofobowych jest fakt, że niezużyty przez bakterie substrat może prowadzić do skomplikowanego procesu izolowania biosurfaktantu z podłoża pochodowlanego znacząco zwiększając koszty produkcji [167, 168]. Wysoki koszt produkcji oraz mała wydajność to dwa najważniejsze czynniki ograniczające komercjalizację biosurfaktantów.

Prowadząc badania nad produkcją ramnolipidów określono wpływ stężenia substratu, skład podłoża mineralnego oraz wpływ temperatury na wydajność procesu. Otrzymane wyniki przedstawiają rysunki 12-16.



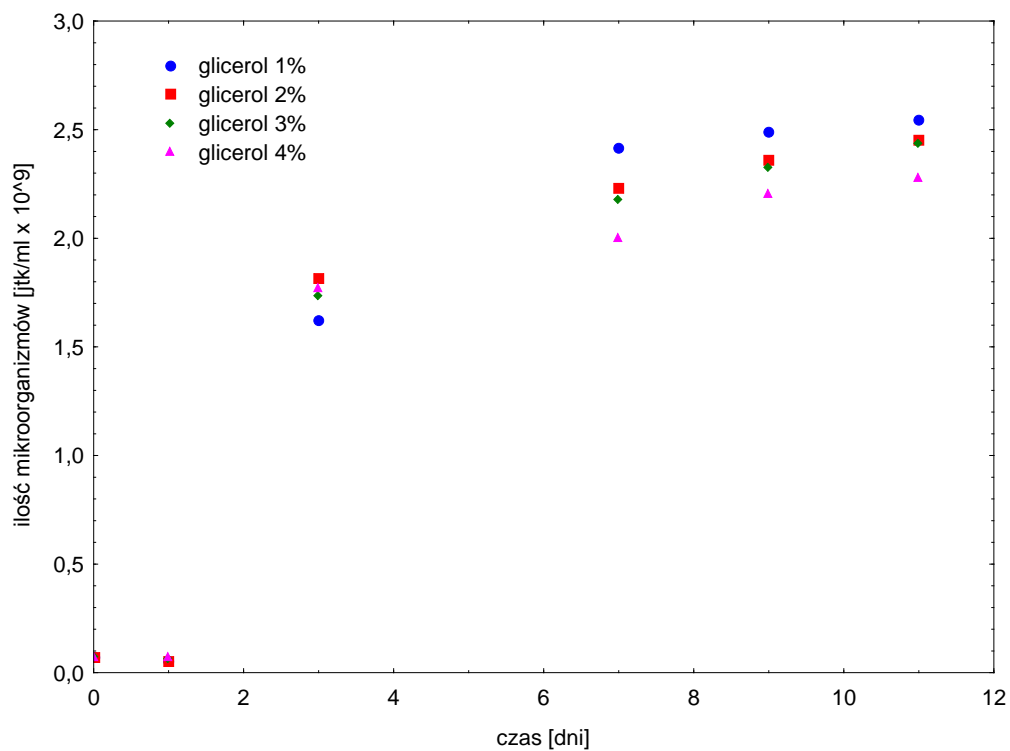
Rys. 12. Zmiana napięcia powierzchniowego i stężenia wytwarzanego ramnolipidu w czasie w hodowlach na różnych podłożach mineralnych z dodatkiem glicerolu w stężeniu 2 g/l.



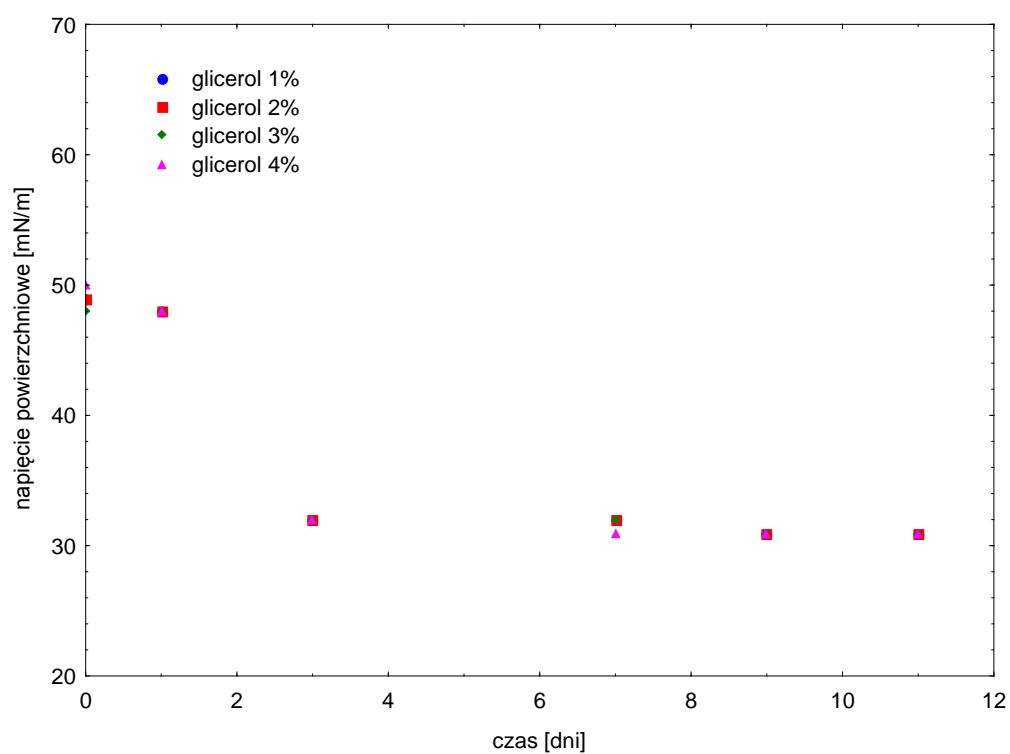
Rys. 13. Przyrost biomasy oraz zmiana stężenia produkowanego ramnolipidu w czasie na różnych podłożach mineralnych z dodatkiem glicerolu w stężeniu 2 g/l.

Na podstawie uzyskanych wyników widać, że podłoże H ma lepiej dobrane proporcje składników mineralnych, ponieważ wydajność produkcji ramnolipidu na tym podłożu jest prawie dwa razy większa niż na podłożu Wei pomimo mniejszego przyrostu biomasy. Wynika stąd, że duży przyrost mikroorganizmów nie koreluje z wysoką produkcją biosurfaktantu, która zależy od metabolizmu przeprowadzanego przez bakterie. Ograniczenie jednego ze składników potrzebnego mikroorganizmom do wzrostu np. azotu powoduje zwiększenie produkcji biosurfaktantów [169]. Nadmiar substratu hydrofobowego może stymulować produkcję biosurfaktantu zmieniając kierunek metabolizmu z produkcji biomasy na produkcję związków powierzchniowo czynnych. Również zmiany temperatury, pH lub składu podłoża mogą hamować wzrost komórek prowadząc do aktywacji enzymów zaangażowanych w produkcję ramnolipidów, która zależy od dostępności węgla, tlenu i energii komórkowej [90].

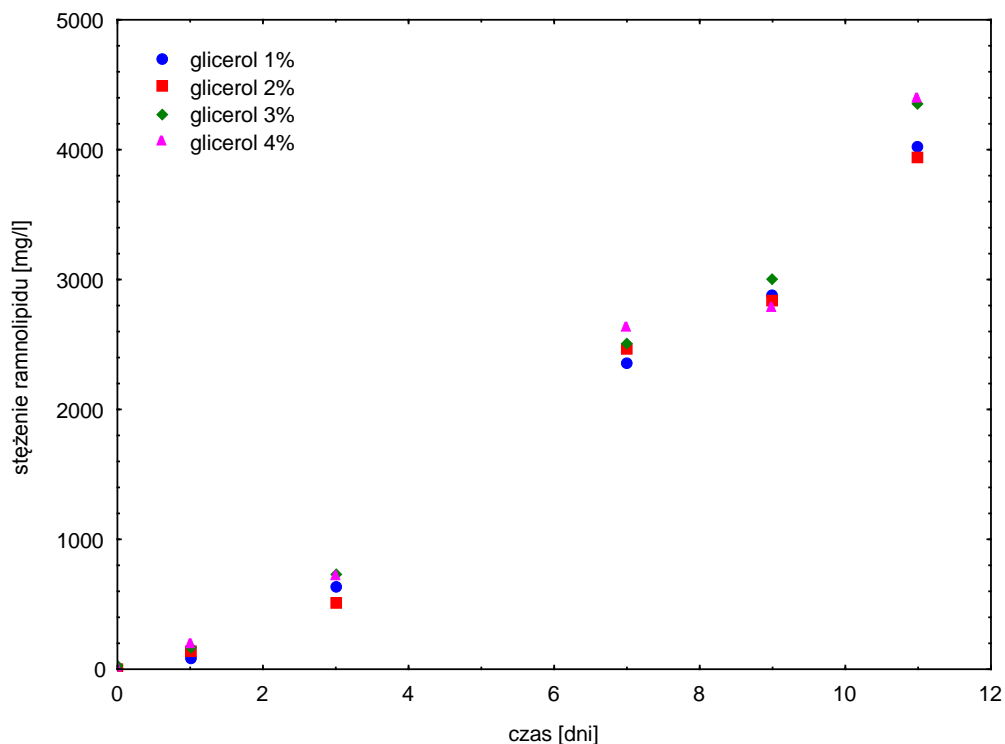
Nie zaobserwowano znaczącego wpływu stężenia substratu (glicerolu) na przyrost biomasy i na produkcję ramnolipidu. Różnica w ilości powstającego ramnolipidu między najmniejszym (1%) a największym (4%) stężeniem glicerolu wynosi 365 mg/l. Dlatego nie warto stosować substratu w dużym stężeniu, gdyż zwiększa to koszty produkcji a nie wpływa na wydajność (Rys. 14 i 16).



Rys. 14. Wzrost liczby bakterii w czasie w zależności od stężenia glicerolu.



Rys. 15. Zmiany napięcia powierzchniowego w czasie w zależności od stężenia glicerolu.



Rys. 16. Zmiany stężenia ramnolipidu w czasie w zależności od stężenia glicerolu.

Odnotowano wyraźny wpływ temperatury na ilość wytwarzanego przez szczep *P. aeruginosa* BI ramnolipidu. W hodowlach inkubowanych w temperaturze 30°C stężenie ramnolipidu było prawie dwukrotnie większe niż w temp. 22°C (Tab. 7).

Tab. 7. Wpływ temperatury na wydajność produkcji ramnolipidu.

Temperatura [°C]	Ilość otrzymanego ramnolipidu [g/l]
22	4
30	7

#### 6.4. ODDZIELENIE BAKTERII OD PODŁOŻA POHODOWLANEGO

Początkowo oddzielono mikroorganizmy przez wirowanie w wirówce laboratoryjnej MPW-350R (MPW-Med. Instruments). Nie była to metoda wygodna, ponieważ do odwirowania większej objętości hodowli trzeba było wykonać kilka cykli wirowania, co było czasochłonne. Ponadto podczas zlewania supernatantu nieuniknione było zawieszanie niewielkiej ilości biomasy, w wyniku czego otrzymany supernatant nie był sterylny i jeśli szybko nie został poddany zabiegom odzyskiwania biosurfaktantu

to namnażały się w nim bakterie. Biosurfaktant uzyskany z supernatantu po wirowaniu zawsze był zanieczyszczony komórkami bakterii w mniejszym lub większym stopniu. Alternatywną metodą oddzielania mikroorganizmów była separacja z zastosowaniem membran.

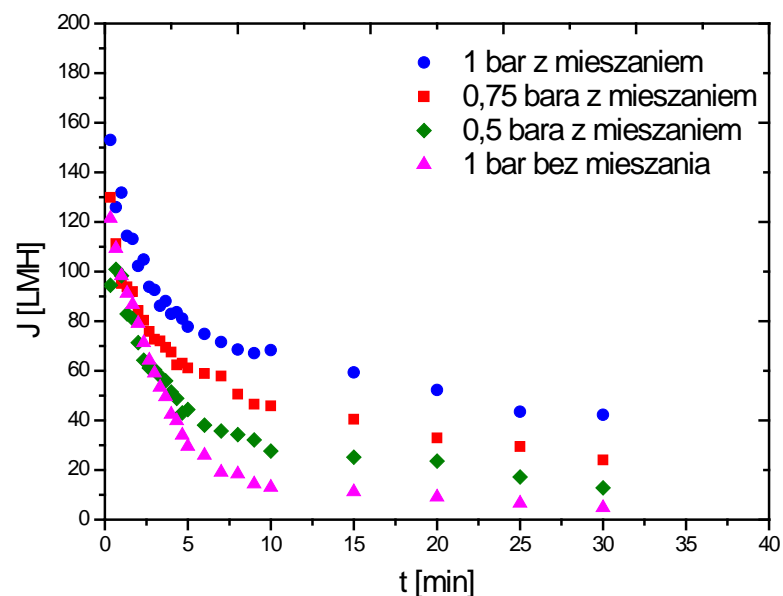
#### 6.4.1. SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE

##### JEDNOKIERUNKOWYM

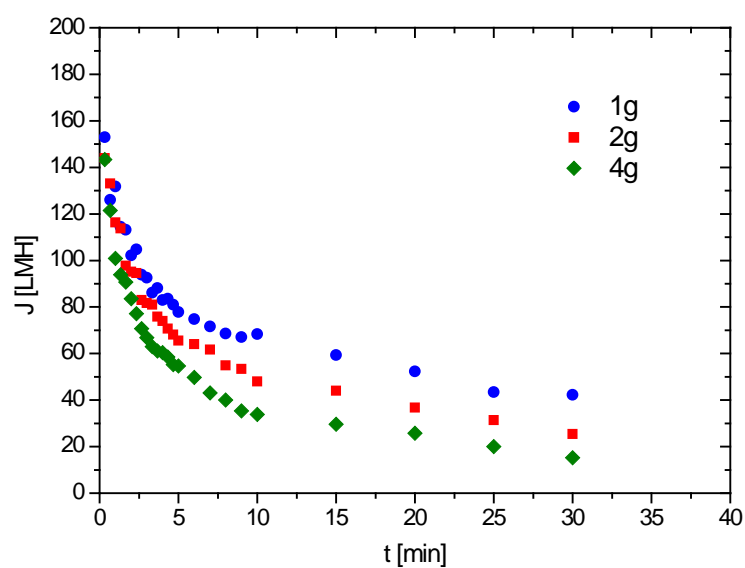
Separacja w układzie jednokierunkowym nie była odpowiednia do filtrowania dużych objętości ponieważ w trakcie procesu obserwowano powstawanie tzw. placka filtracyjnego, który działał jak dodatkowa membrana powodując spadek strumienia. Układu jednokierunkowego użyto jedynie w celu znalezienia membrany o właściwych wielkościach porów. Membrana powinna być tak dobrana, żeby zatrzymywała mikroorganizmy przy zachowaniu jak największego strumienia. Jako pierwszą przetestowano membranę mikrofiltracyjną o wielkości porów 0,1  $\mu\text{m}$ . Jednak nie otrzymano zadowalających wyników, ponieważ nie można było uzyskać stabilnego strumienia. Ponadto nie udało się domyc membrany po procesie tak by odzyskała swoje pierwotne właściwości co świadczy o obecności zjawiska *foulingu*, w wyniku którego zostały zablokowane pory w membranie. *Fouling* występuje najczęściej wtedy, gdy pory są na tyle duże, że separowane cząsteczki mogą częściowo wnikać do wnętrza porów membrany. Z wymienionych powodów odrzucono membranę mikrofiltracyjną na rzecz membrany ultrafiltracyjnej o granicznej masie molowej (MWCO) 100 kDa.

Zbadano wpływ ciśnienia w zakresie 0,5-1 barów na separację hodowli bakterii *Pseudomonas aeruginosa* o stężeniu 1 g/l. Ponadto zbadano wpływ mieszania na proces przy ciśnieniu 1 bar. Mieszanie powodowało wzrost sił ścinających przy powierzchni membrany jednocześnie zwiększając strumień. Działo się tak dlatego, że mieszanie wytwarzało większe turbulencje wokół powierzchni membrany, które w konsekwencji redukowały opór warstwy polaryzacyjnej skutkiem czego wzrastał strumień. Ze wzrostem prędkości mieszania wzrastał stopień transportu zwrotnego, który prowadził do usuwania cząsteczek separowanej substancji z powierzchni membrany do surowca [170]. Otrzymano największy strumień dla największego ciśnienia (1 bar) z zastosowaniem mieszania. Najmniejszy strumień uzyskano podczas procesu bez mieszania pomimo zastosowania największego ciśnienia (1 bar). Najlepsze warunki dla

przewodzenia separacji mikroorganizmów to: ciśnienie 1 bar i mieszanie przy 250 obr/min. Niestety jak widać na rysunku 17 nie otrzymano stabilnego strumienia, obserwowano tendencję spadkową przez cały czas trwania eksperymentu, co świadczy o tworzeniu się placka filtracyjnego.



Rys. 17. Wpływ ciśnienia oraz mieszania na strumień permeatu w układzie jednokierunkowym.



Rys. 18. Wpływ stężenia mikroorganizmów na strumień permeatu w układzie jednokierunkowym.



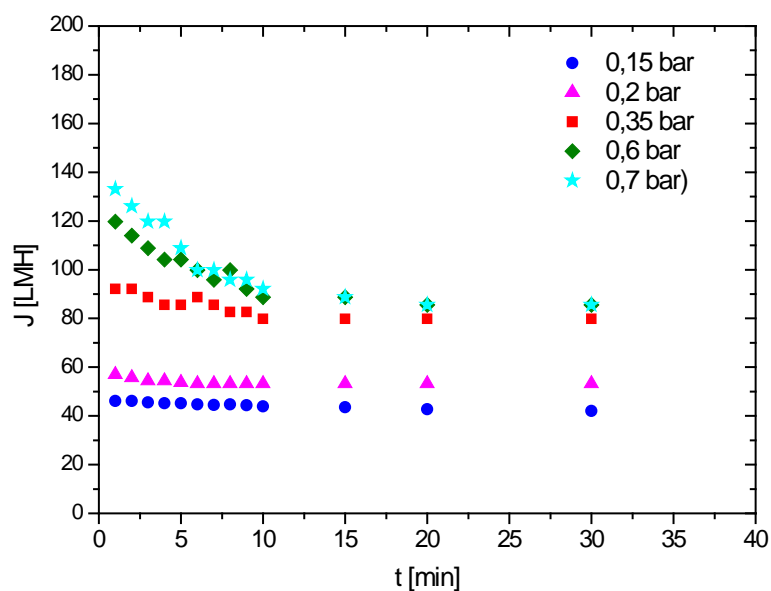
Mierzono strumienie permeatu podczas separacji zawiesin bakterii *Pseudomonas aeruginosa* o różnych stężeniach mikroorganizmów i stałym ciśnieniu o wartości 1 bara. Im bardziej gęsta była zawiesina tym bardziej spadał strumień, dlatego najlepszy strumień otrzymano dla zawiesiny o stężeniu 1 g/l a najgorszy dla stężenia 4 g/l. Tu również zanotowano brak stabilności strumienia spowodowany tworzeniem się placka filtracyjnego (Rys. 18). Na membranie ultrafiltracyjnej nie zaobserwowano zjawiska *foulingu* jednak tworzący się podczas separacji placek filtracyjny powoduje, że układ ten nie jest odpowiedni do oddzielania mikroorganizmów z dużych objętości hodowli.

#### 6.4.2. SEPARACJA MIKROORGANIZMÓW W UKŁADZIE KRZYŻOWO-PRĄDOWYM

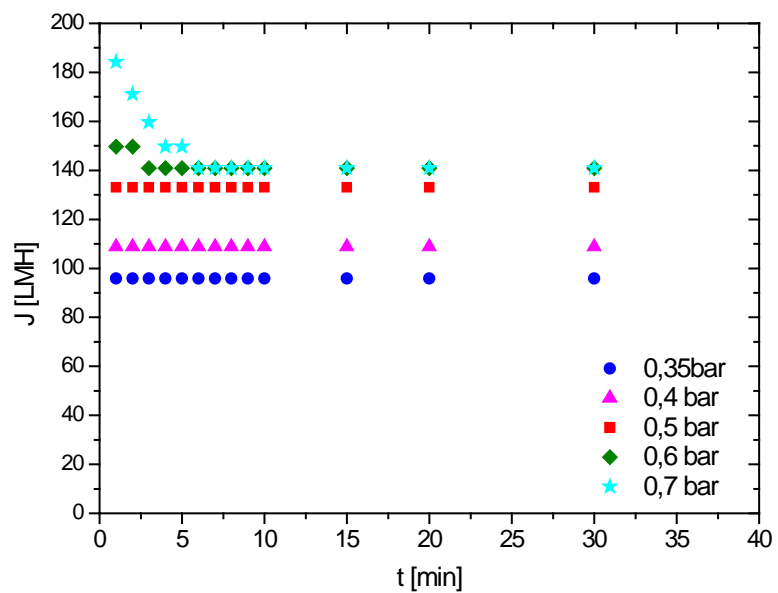
Filtracja w układzie krzyżowo-prądowym różni się od modułu jednokierunkowego tym, że retentat przepływa równolegle do powierzchni membrany. W układzie jednokierunkowym hydrodynamiczne siły ciągną cząsteczki w kierunku powierzchni membrany w wyniku czego powstaje placek filtracyjny. Pomimo, że układ krzyżowo-prądowy ogranicza powstawanie placka filtracyjnego, spadek strumienia z powodu *foulingu* jest wciąż istotny. Wiele metod może zredukować *fouling* np. zmiana w powierzchniowych oddziaływaniach pomiędzy cząsteczkami, zmiana hydrofilności membrany, mycie membrany różnymi środkami, okresowe wmywanie i wmywanie zwrotne. Ogólnie wmywanie zwrotne jest najbardziej obiecującą metodą dla czyszczenia membrany poprzez okresowe spadki zwrotnego ciśnienia transmembranowego. Wmywanie zwrotne pozwala używać systemu dłużej przed zatrzymaniem na intensywne fizyczne lub chemiczne mycie. Ponadto okresowe zwrotne wmywanie jest odpowiednie do zastosowania w filtracji z układem krzyżowo-prądowym w celu zwiększenia strumienia [171].

Badania w układzie krzyżowo-prądowym wykonano w Zakładzie Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Wrocławskiej. Do separacji mikroorganizmów wykorzystano instalację AMICON SP-20 z membraną kapilarną o MWCO 100 kDa wykonaną z polisulfonu. Powierzchnia permeacji wynosiła 4507 cm<sup>2</sup>. W celu uniknięcia zanieczyszczenia instalacji żywymi komórkami bakterii *Pseudomonas aeruginosa* hodowlę przed separacją wysterylizowano w autoklawie w temperaturze 121 °C pod ciśnieniem 2 atmosfer przez 20 min. Ramnolipidy zachowują stabilność

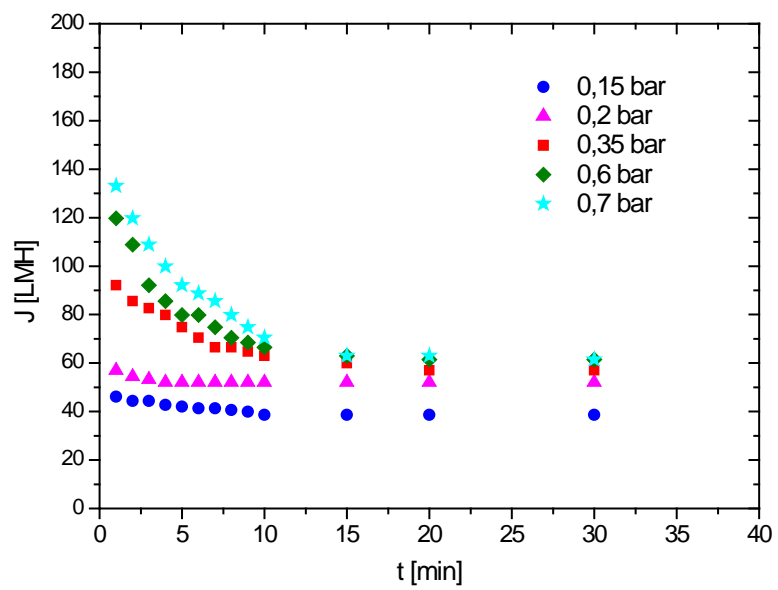
oraz aktywność powierzchniową w szerokim zakresie temperatur, pH i zasolenia. Poddanie ich działaniu temperatury 100 °C w czasie 90 min, ciśnienia o wartości 101 kPa w czasie 15 min nie powoduje zmian w ich zdolności do redukcji napięcia powierzchniowego. Podobnie pH w zakresie 5-10 i dodatek 3,5% NaCl nie wpływa na stabilność ramnolipidów [90]. W celu uzyskania optymalnych warunków separacji mikroorganizmów w układzie krzyżowo-prądowym zbadano wpływ prędkości przepływu surowca oraz stężenia bakterii na strumień permeatu. Prędkość przepływu surowca mieściła się w zakresie 0,5-1,5 m/s, podczas gdy stężenie biomasy w zakresie 1-4 g/l. Strumień permeatu mierzono dla różnych wartości ciśnień (0-0,7 barów). Otrzymane wyniki przedstawia rysunek (Rys. 19 a-f).



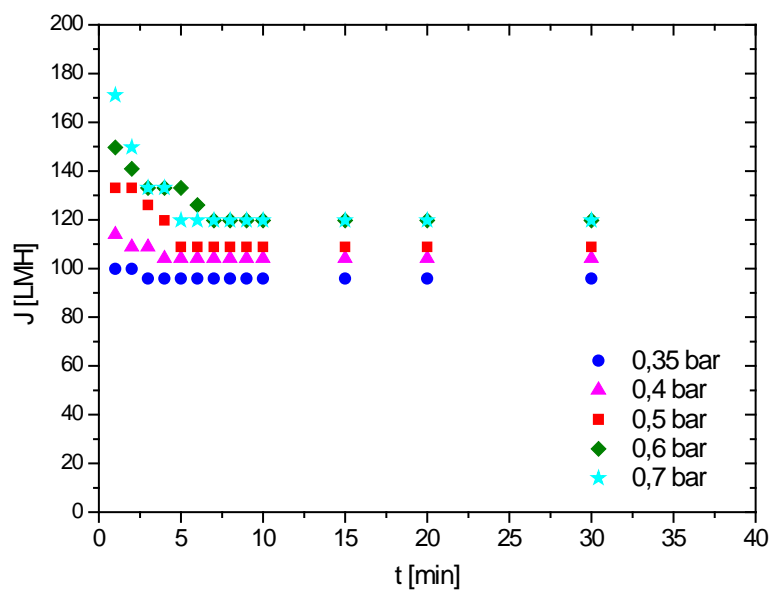
a)



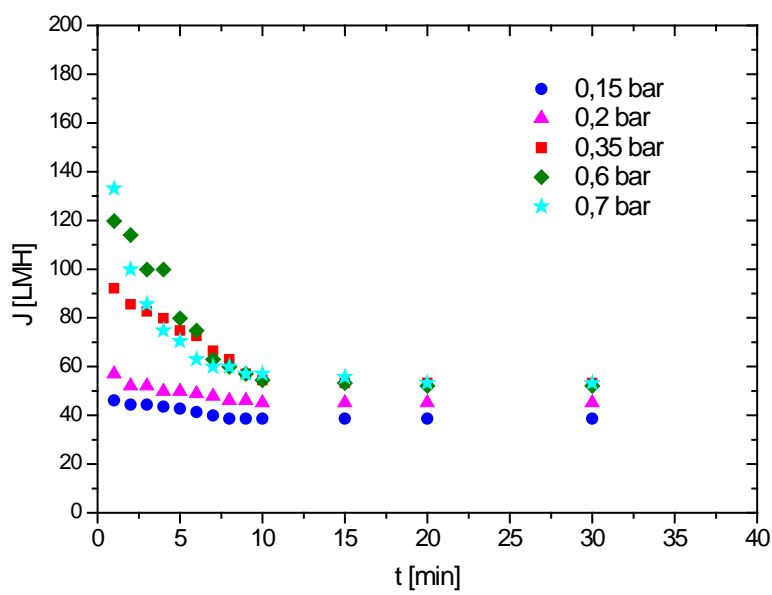
b)



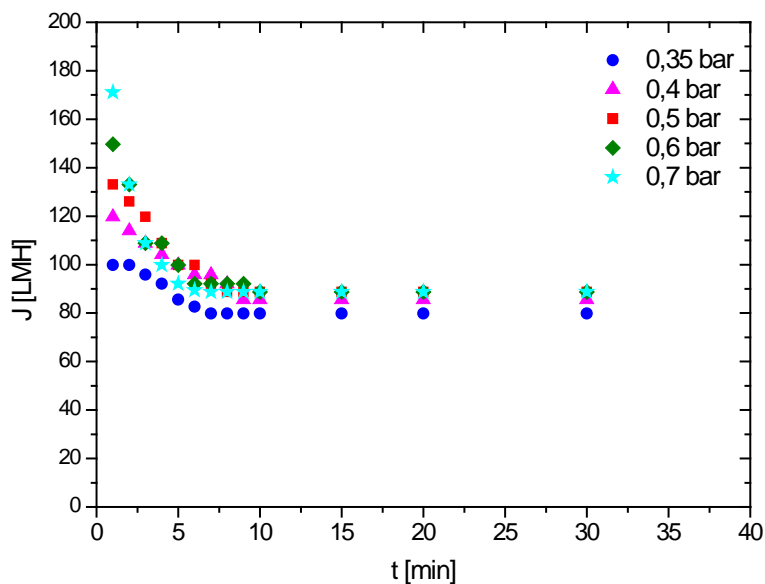
c)



d)



e)



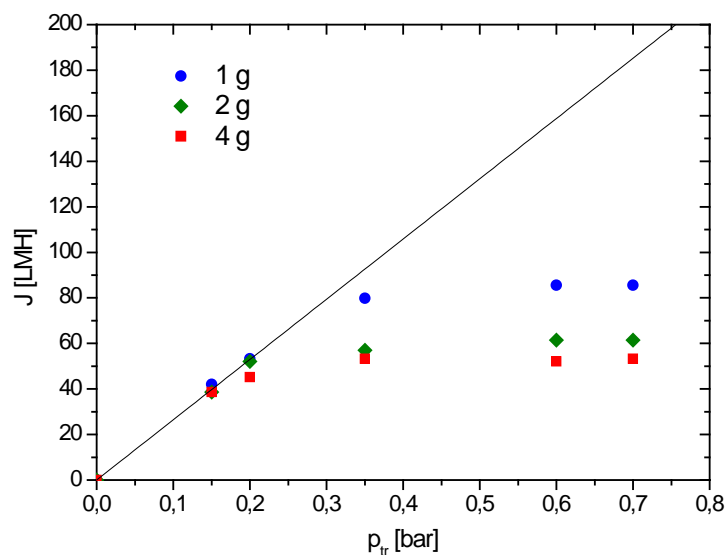
f)

Rys. 19. Strumień permeatu w trakcie ultrafiltracji *Pseudomonas aeruginosa* w układzie krzyżowo-prądowym, przy różnych ciśnieniach transmembranowych i stężeniach biomasy: a) 1 g/l; 0,5 m/s; b) 1 g/l; 1,5 m/s; c) 2 g/l; 0,5 m/s; d) 2 g/l; 1,5 m/s; e) 4 g/l; 0,5 m/s; f) 4 g/l; 1,5 m/s.

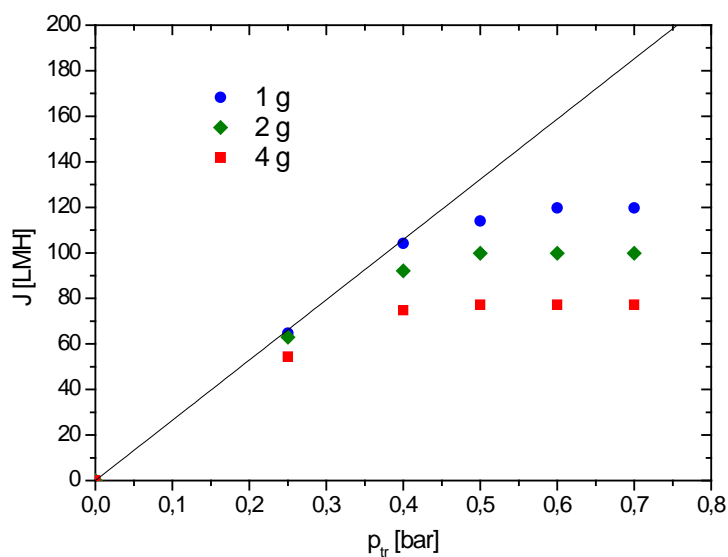
Największe strumienie otrzymano dla zawiesiny o najmniejszym stężeniu czyli 1 g/l i dla największej prędkości przepływu surowca czyli 1,5 m/s. Ważnym parametrem jest również strumień krytyczny, czyli najwyższy strumień permeatu leżący na prostej przedstawiającej charakterystykę membrany dla wody. Należy tak dobrać warunki procesu, żeby pracować poniżej wartości strumienia krytycznego, ponieważ tylko wtedy można otrzymać wysoki strumień permeatu przy stosunkowo niskim ciśnieniu. Dzięki temu nie powstaje plasek filtracyjny i proces jest najbardziej ekonomiczny.

Na podstawie wykresów zależności strumienia permeatu od ciśnienia transmembranowego (Rys. 20) wyznaczono wartości strumieni krytycznych dla poszczególnych prędkości przepływu oraz stężeń zawiesiny. Dla prędkości 0,5 m/s (Rys. 20a) i stężeń 1, 2 i 4 g/l strumień krytyczny uzyskano przy odpowiednio 0,3; 0,2; 0,15 bar. Po zwiększeniu prędkości do 1 m/s (Rys. 20b) ciśnienia krytyczne zwiększyły się odpowiednio do 0,4; 0,3; 0,2 bar, natomiast po zwiększeniu prędkości o kolejne 0,5 m/s (Rys. 20c) – 0,5; 0,4; 0,3 bar dla kolejnych stężeń. Dla stężenia 1 g/l strumienie

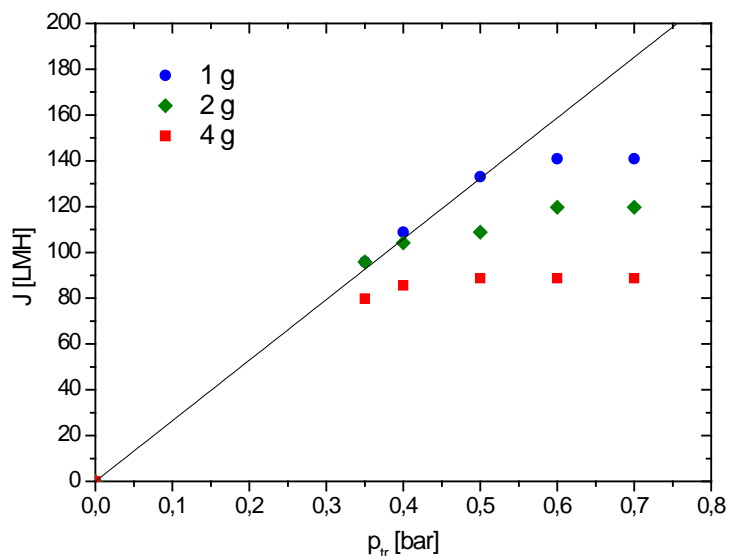
krytyczne wynosiły: dla prędkości 0,5 m/s ok. 70 LMH, dla 1 m/s 110 LMH, natomiast dla 1,5 m/s 130 LMH. Podczas pracy przy stężeniu 2 g/l, strumienie te wynosiły odpowiednio 50, 80 i 110 LMH, natomiast przy 4 g/l – 35, 50 i 80 LMH.



a)



b)



c)

Rys. 20. Wpływ stężenia biomasy na strumień permeatu przy ultrafiltracyjnej separacji *Pseudomonas aeruginosa* w układzie krzyżowo-prądowym, przy różnych ciśnieniach transmembranowych. Prędkość retentatu a) 0,5 m/s, b) 1 m/s, c) 1,5 m/s.

## 6.5. OCZYSZCZANIE RAMNOLIPIDU

Ramnolipidy są surfaktantami pochodzenia naturalnego o charakterze anionowym. Badania nad separacją surfaktantów anionowych w stężeniach niższych od CMC wskazują, że w przypadku MWCO porównywalnego lub niewiele mniejszego od wielkości monomerów zachodzi adsorbcja na powierzchni membrany lub wewnątrz jej porów powodując spadek strumienia. W przypadku porów dużo mniejszych niż monomer nie ma adsorbcji wewnątrz porów jedynie zachodzą zmiany na powierzchni membrany. W przypadku membran hydrofobowych następuje adsorbcja hydrofobowych ogonów surfaktantu powodując zwiększenie zwilżalności co z kolei powoduje zwiększenie strumienia podczas gdy na membranie hydrofilowej adsorbują się hydrofilowe głowy surfaktantu powodując zmniejszenie zwilżalności w wyniku czego obserwuje się spadek strumienia. Wynika stąd zależność strumienia od hydrofobowości membrany.

Biosurfaktanty charakteryzują się unikalną cechą, mianowicie powyżej krytycznego stężenia micelnego (CMC) pojedyncze cząsteczki biosurfaktantu łączą się w duże agregaty zwane micelami. Micele mogą mieć średnice większe od pojedynczych cząsteczek o 2-3 rzędy wielkości [172,153]. Biosurfaktanty w formie micel są zatrzymywane przez membrany o odpowiedniej granicznej masie molowej (MWCO). W podłożu pohodowlanym znajdują się małe cząsteczki takie jak glicerol oraz substancje mineralne oraz duże cząsteczki takie jak ramnolipid występujący w postaci micel oraz białka. W pracy do oczyszczenia biosurfaktantu zaproponowano dwustopniowy proces ultrafiltracji. Proces ten w przeciwieństwie do kolumnowej chromatografii cieczowej, metody bardzo często używanej do oczyszczania biosurfaktantów, nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych ani żadnych innych odczynników w wyniku czego jest procesem przyjaznym środowisku i bezodpadowym.

#### 6.5.1. ULTRAFILTRACJA – ETAP I

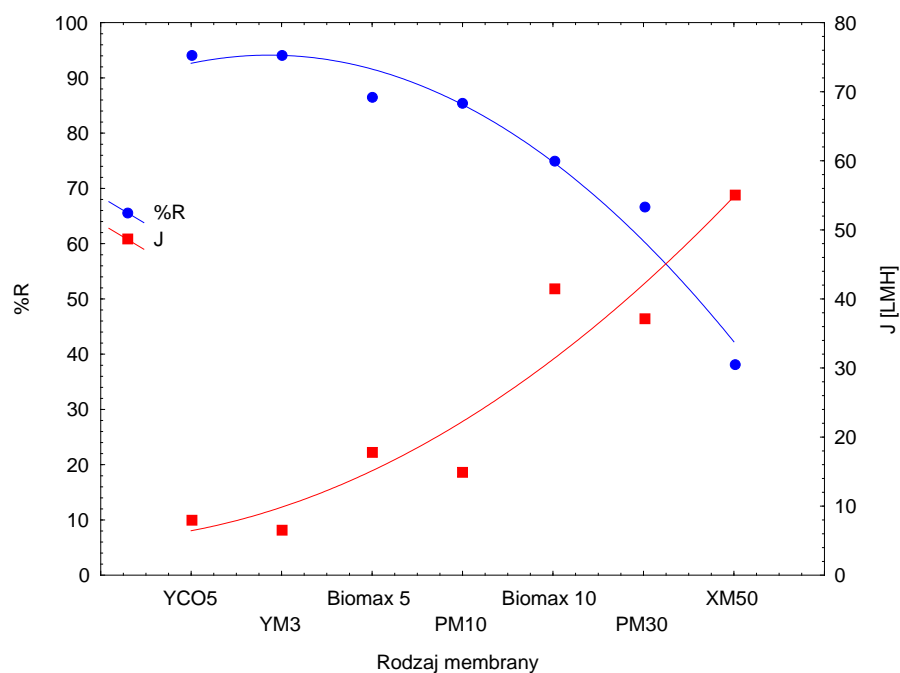
Ramnolipidy mogą być efektywnie zatrzymywane na membranach dzięki temu, że powyżej krytycznego stężenia micelnego tworzą micidele, które są większe o 2-3 rzędy wielkości od pojedynczych cząsteczek. Wykorzystując tę właściwość można zatrzymać micidele ramnolipidu w retencji w I etapie ultrafiltracji, osiągając tym samym pewien stopień oczyszczenia z zanieczyszczeń o małej masie molowej, które zostaną przepuszczone przez membranę. W celu dobrania właściwej membrany proces ultrafiltracji prowadzono z zastosowaniem mieszania z prędkością 250 obr/min i przy użyciu ciśnienia o wartości 120 kPa. Stężenie ramnolipidu w płynie pohodowlanym wynosiło 3 g/l, a jego pH 6. Zastosowano membrany zestawione w tabeli 8.

Tab. 8. Membrany testowane w I etapie ultrafiltracji.

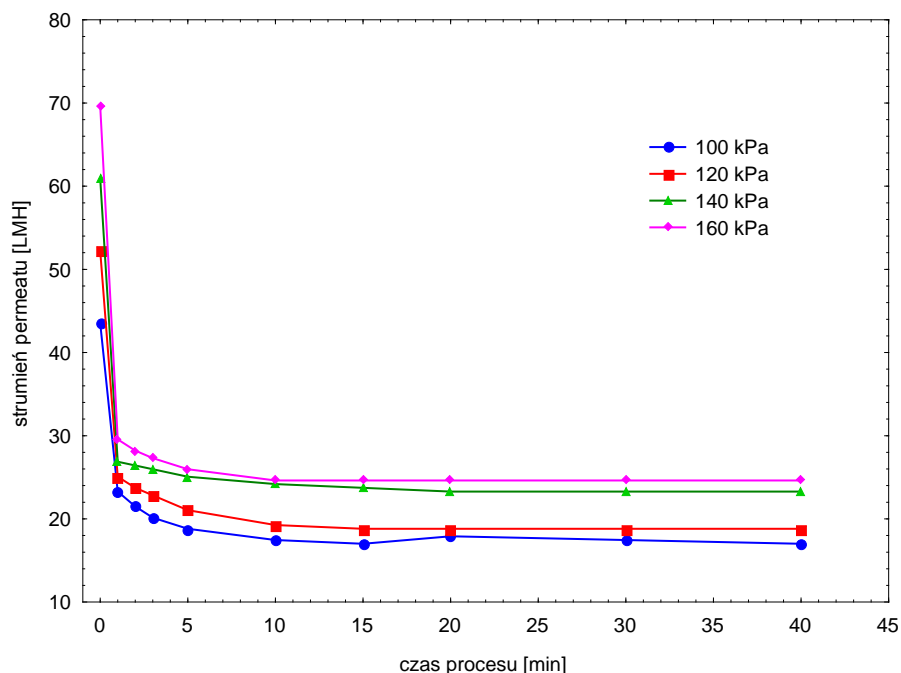
<b>Membrana</b>	<b>Materiał</b>	<b>MWCO [Da]</b>
YC05	regenerowana celuloza	500
YM3	octan celulozy	3000
Biomax5	polieterosulfon	5000
PM10	polisulfon	10000
Biomax10	polieterosulfon	10000
PM30	polisulfon	30000
XM50	kopolimer polichlorku winylu i poliakrylonitrylu	50000



Spośród przetestowanych membran wybrano membranę Biomax 5, która charakteryzowała się wysokim stopniem zatrzymania wynoszącym prawie 90% przy stosunkowo wysokim strumieniu permeatu (Rys. 21). O właściwym doborze membrany świadczą stabilne strumienie (Rys. 22), które nie zmniejszały się z upływem czasu. Na proces ultrafiltracji wpływają takie parametry jak masa cząsteczkowa substancji rozpuszczonej, ciśnienie transmembranowe, pH próbki, początkowe stężenie substancji w próbce oraz polaryzacja stężeniowa powodowana akumulowaniem się substancji na powierzchni membrany (można ją zredukować przez efektywne mieszanie) [173]. Ultrafiltracja jest ciśnieniową techniką rozdziału, dlatego ciśnienie transmembranowe odgrywa istotną rolę w wydajności membrany i procesie separacji. Ciśnienie w badanym zakresie miało niewielki wpływ na strumień permeatu (Rys. 23). Niemniej jednak dalsze badania prowadzono przy ciśnieniu 140 kPa, ponieważ przy tym ciśnieniu strumień permeatu był prawie najwyższy. Strumień przestał rosnąć przy ciśnieniu 140 kPa, co mogło być częściowo spowodowane efektem polaryzacji stężeniowej. Polaryzacja stężeniowa prowadzi do powstawania placka filtracyjnego, kiedy stężenie separowanego składnika przy powierzchni membrany osiągnie granicę rozpuszczalności. Polaryzacja stężeniowa wydaje się być obecna w pewnym stopniu w każdym procesie membranowym z powodu podstawowych ograniczeń transportu

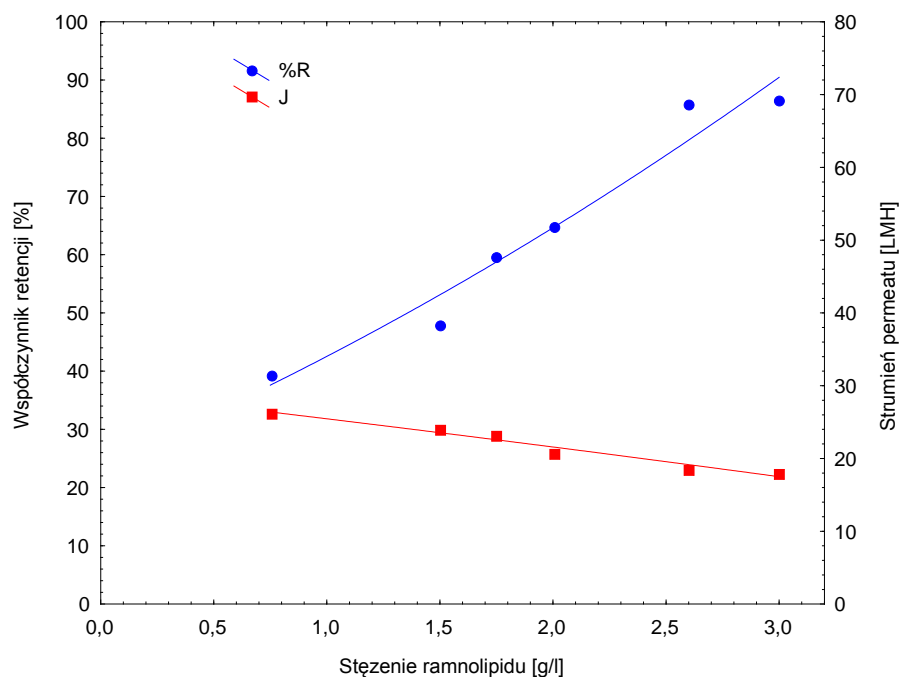


Rys. 21. Zależność stopnia zatrzymania i strumienia permeatu od rodzaju membrany.

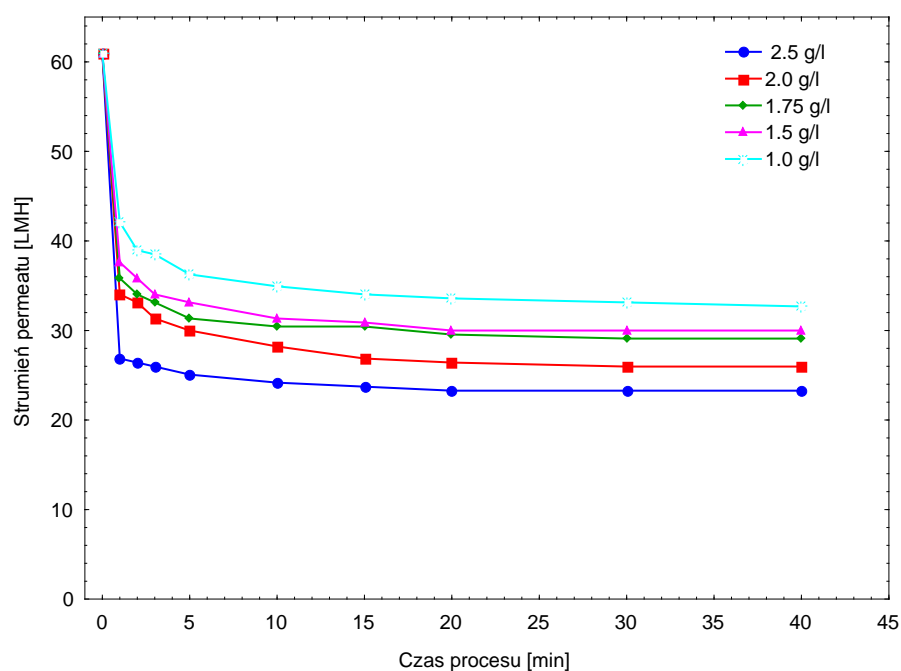


Rys. 22. Zależność strumienia permeatu od czasu przy różnych ciśnieniach.

masy oraz obecności warstwy przyściennej [174]. Ponadto wzrost ciśnienia transmembranowego powoduje wzrost strumienia tylko do pewnej granicznej wartości zwanej strumieniem krytycznym kiedy to wzrasta oporność placka filtracyjnego, dlatego strumień nie może przekraczać strumienia krytycznego. Ciśnienie transmembranowe aktywuje również konwekcyjny transport masy cząsteczek separowanego składnika [175]. Wpływ stężenia ramnolipidu na stopień zatrzymania oraz na strumień permeatu przedstawiają odpowiednio rysunki 24 i 25. Stopień zatrzymania rósł wraz ze stężeniem ramnolipidu, ale powyżej stężenia 2,5 g/l już się nie zmieniał. Natomiast strumień był stabilny i nie ulegał zmniejszeniu wraz z upływem czasu. Ponadto strumień spadał wraz ze wzrostem stężenia ramnolipidu najprawdopodobniej z powodu polaryzacji stężeniowej. Polaryzacja stężeniowa jest również zjawiskiem, które zwykle towarzyszy *foulingowi*. Przy wysokich stężeniach solutu istnieje możliwość, że placki filtracyjny lub *fouling* powierzchniowy dominuje. Kiedy występuje *fouling* powierzchniowy wzrastające stężenie surowca ma mały wpływ na nieodwracalny *fouling* membrany, ale powoduje wzrost w odwracalnym tworzeniu się placka filtracyjnego. Stopień zatrzymania substancji tworzących micelle jest wyższy przy wyższych stężeniach tych związków w surowcu [175].



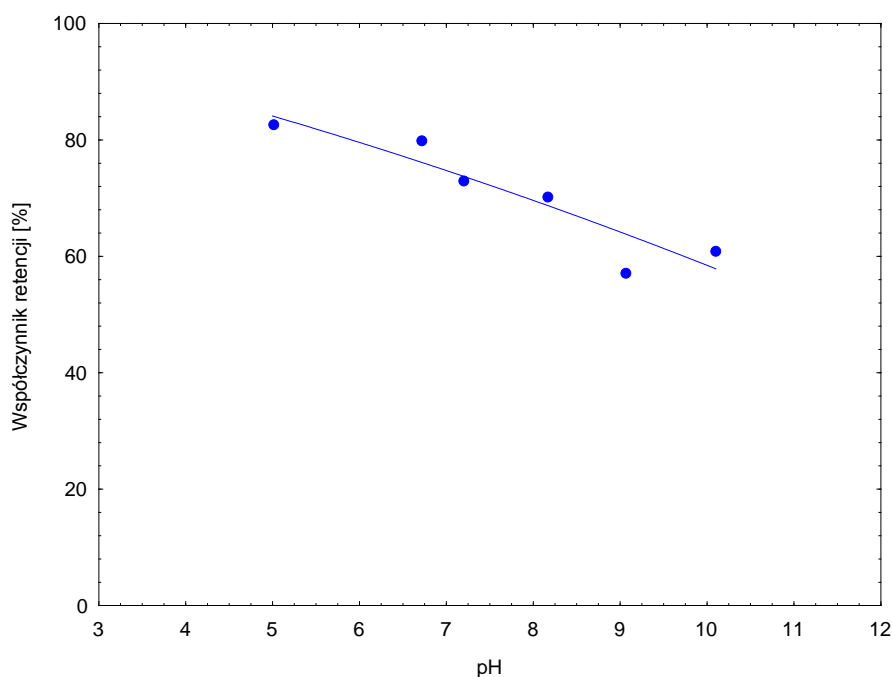
Rys. 23. Wpływ stężenia ramnolipidu na stopień zatrzymania.



Rys. 24. Wpływ stężenia ramnolipidu na strumień permeatu.

Wpływ pH na stopień zatrzymania przedstawiono na rysunku 25. Stopień zatrzymania rósł wraz ze zmniejszaniem się pH. Prawdopodobnie przy niskim pH w roztworze dominują protonowe formy a zbita monomolekularna warstwa tworzy się w przestrzeni międzyfazowej w wyniku powstania wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami

ramnolipidów. Na rodzaj tworzących się agregatów duży wpływ ma pH szczególnie w zakresie 6-7 ponieważ grupa ramnozyłowa ma  $pK_a=5,6$ . Przy niskim pH ( $<6$ ) grupa ramnozyłowa jest przynajmniej w 50% nienaładowana i ramnolipidy tworzą duże agregaty w postaci pęcherzyków o podobnej budowie do liposomów. Między pH 6-6,5 ramnolipidy tworzą albo struktury lamelarne albo agregaty lipidowe, a przy pH 7 kiedy to grupa ramnozyłowa jest ujemnie naładowana tworzą się micelle [176].

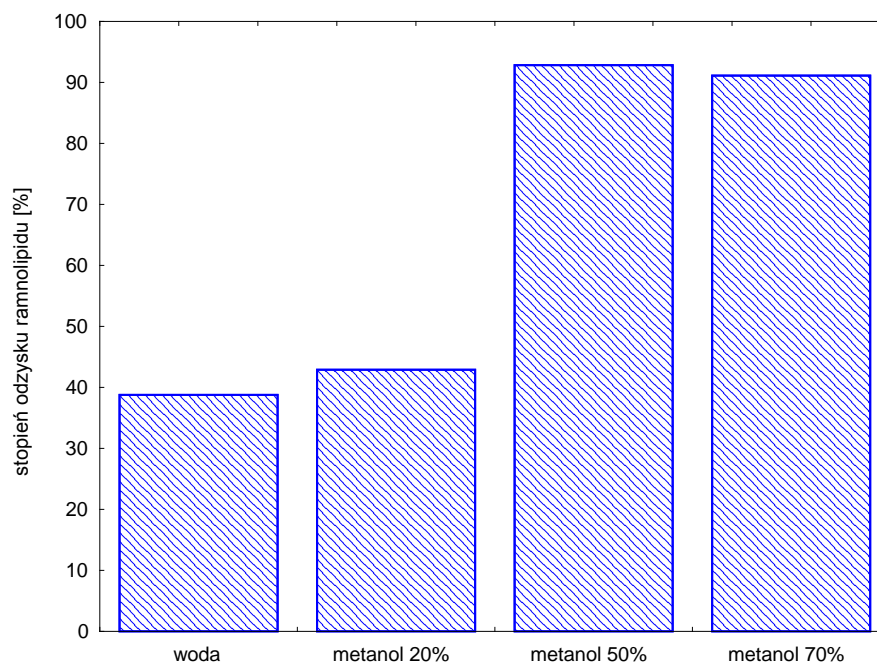


Rys. 25. Wpływ pH na stopień zatrzymania.

### 6.5.2. ULTRAFILTRACJA – ETAP II

Retentat otrzymany w pierwszym etapie ultrafiltracji zawierał zatężone micelle ramnolipidu oraz białka. Istnieje możliwość oddzielenia ramnolipidu od białek w drugim etapie ultrafiltracji po zniszczeniu micel i uzyskaniu ramnolipidu w postaci monomerów, tak żeby membrana zatrzymała białka a ramnolipid został odzyskany w permeacie. Rozpuszczalniki organiczne takie jak alkohole mogą tworzyć z cząsteczkami surfaktantów strukturę palisadową co powoduje obniżenie wolnej energii. Rozpuszczalniki organiczne wpływają na tworzenie micel i gdy zostaną dodane do roztworu surfaktantu konkurują z monomerem w celu zajęcia miejsca micel [177]. Rozcieńczenie retentatu alkoholem o odpowiednim stężeniu spowoduje uzyskanie ramnolipidu w postaci monomerów. Wpływ stężenia metanolu na stopień odzysku

ramnolipidu w permeacie przedstawia rysunek 26. Wzrost stężenia metanolu powodował spadek stabilności micel lub prawdopodobnie zmniejszenie rozmiaru cząsteczek, dlatego ze wzrostem stężenia metanolu spadał stopień zatrzymania (ramnolipid przechodził przez membranę do permeatu) i rósł stopień odzysku ramnolipidu w permeacie. Przy stężeniu 50% metanol efektywnie niszczył prawie wszystkie micelle i tylko ok. 7% ramnolipidu było zatrzymane przez membranę. Wzrost stężenia metanolu powodował wzrost stopnia odzysku ramnolipidu. Metanol powodował ponadto agregację cząsteczek białek dzięki czemu białka zatrzymywane były w retentacie. Permeat z drugiego etapu ultrafiltracji był mieszaniną ramnolipidu i metanolu. Metanol jednak można łatwo odzyskać przy pomocy wyparki próżniowej przy zmniejszonym ciśnieniu. Odzyskany metanol można użyć ponownie do destabilizacji micel w drugim etapie ultrafiltracji [175]. W celu ustalenia jakie stężenie metanolu było wystarczające do prawie całkowitego zdestabilizowania micel retentat rozcieńczano 10 razy zgodnie z informacją znalezioną w literaturze [178]. Stwierdzono, że stężenie metanolu 50% było wystarczające do prawie całkowitego zdestabilizowania struktur micelarnych ramnolipidu.



Rys. 26. Wpływ stężenia metanolu na stopień odzysku ramnolipidu w permeacie.

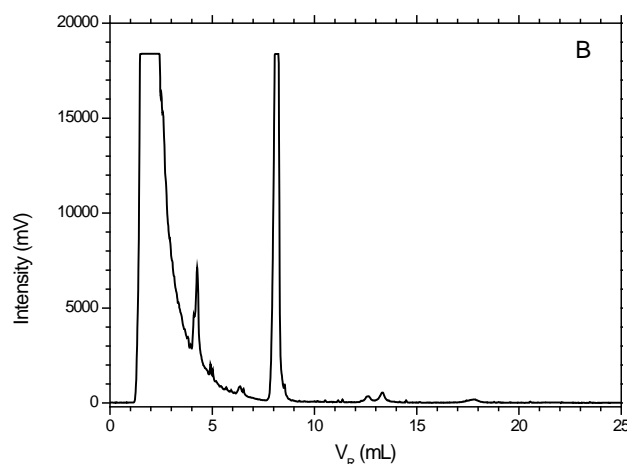
Poza stężeniem alkoholu istotne było ile razy należało rozcieńczyć uzyskany w pierwszym etapie ultrafiltracji retentat. Dlatego zbadano również wpływ 50%

metanolu na destabilizację micel po rozcieńczeniu retentatu 5 razy. Otrzymano równie zadowalający wynik jak w przypadku rozcieńczenia 10 razy dzięki czemu objętość otrzymanego permeatu była 2 razy mniejsza. Rozcieńczenie retentatu 50% metanolem powodowało odzyskanie ramnolipidu w permeacie na poziomie 93% w obu przypadkach (Tab. 9).

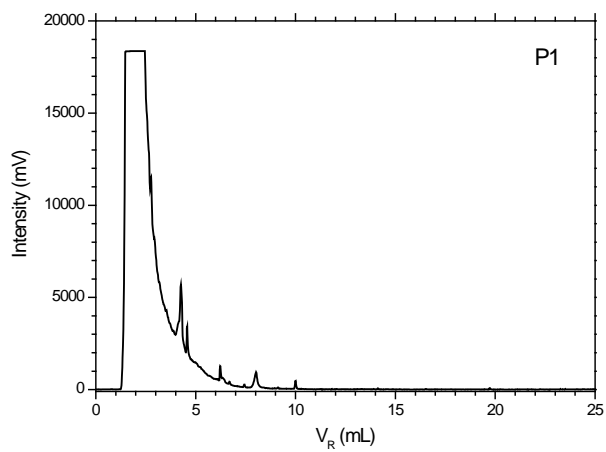
Tab. 9. Wpływ rozcieńczenia retentatu 50% metanolem na stopień odzysku ramnolipidu w permeacie.

Rozcieńczenie	Stopień odzysku ramnolipidu [%]
10x	92,8
5x	90,4

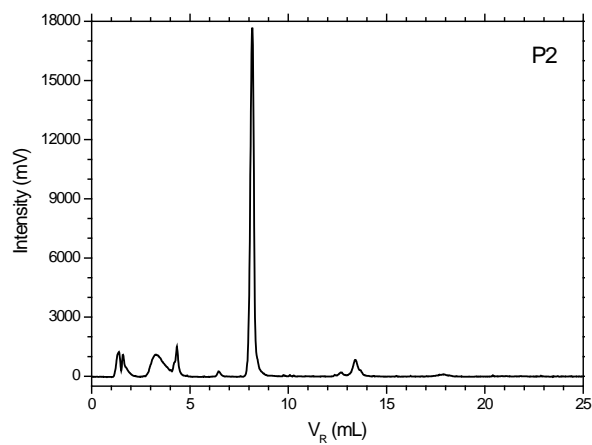
Rys. 27 (a-d) przedstawia chromatogramy LC-MS płynu pochodowlanego (B), permeatu z pierwszego (P1) i drugiego etapu ultrafiltracji (P2) oraz roztworu ramnolipidu oczyszczonego poprzez ekstrakcję z octanem etylu (E). Obecność ramnolipidu RL2 w roztworze sygnalizował najbardziej intensywny pik o czasie retencji 8 min, natomiast niewielką ilość ramnolipidu RL1 pik o czasie retencji 13 min. Większość zanieczyszczeń obecnych w podłożu pochodowlanym została usunięta w pierwszym etapie procesu – permeat (P1) nie zawierał ramnolipidu tylko same zanieczyszczenia. Retentat z tego etapu po rozcieńczeniu alkoholem poddano jeszcze raz ultrafiltracji otrzymując permeat (P2) zawierający ramnolipid oraz śladowe ilości zanieczyszczeń. Ramnolipid po procesie ultrafiltracji charakteryzował się większą czystością w porównaniu do tego oczyszczonego metodą ekstrakcji rozpuszczalnikiem.



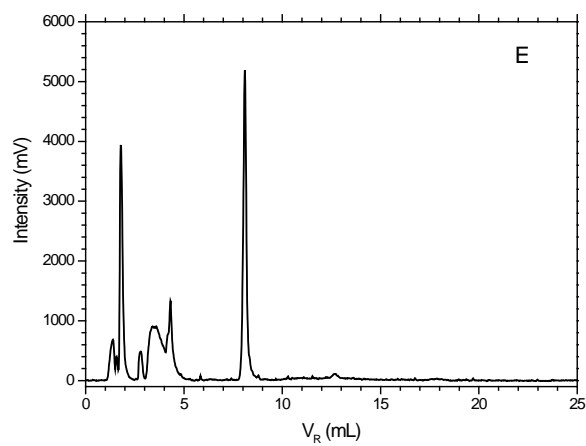
a)



b)



c)

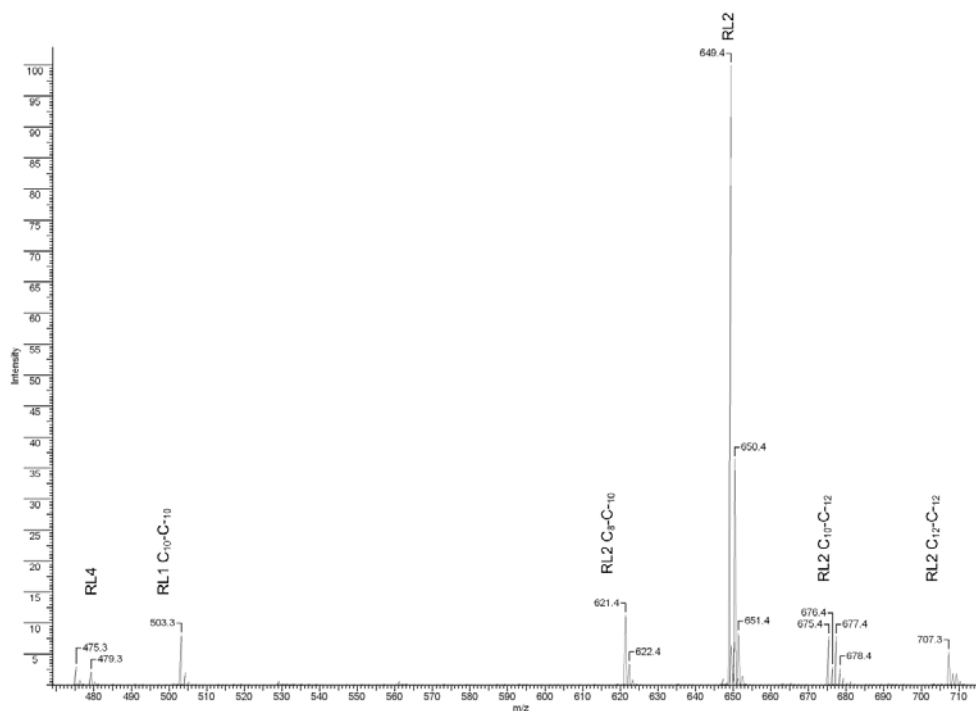


d)

Rys. 27. Chromatogramy LC-MS: a) płynu pochodzącego (B), b) permeatu z pierwszego etapu ultrafiltracji (P1), c) permeatu z drugiego etapu ultrafiltracji (P2), d) roztworu ramnolipidu oczyszczonego poprzez ekstrakcję z octanem etylu (E).

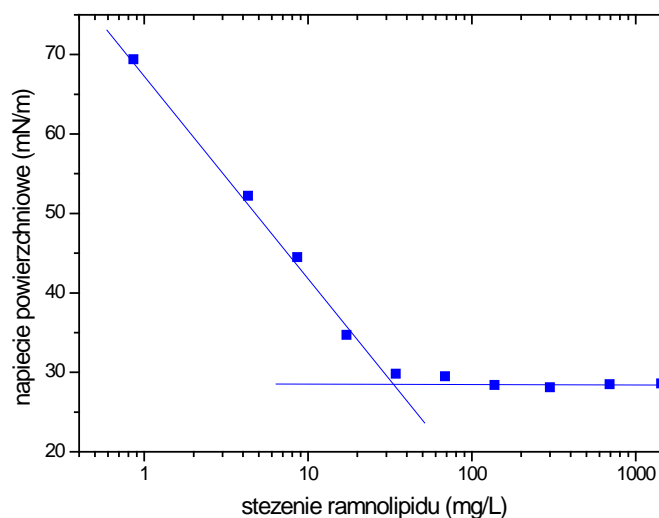
## 6.6. WŁAŚCIWOŚCI OTRZYMANEGO RAMNOLIPIDU

Biosurfaktant wyizolowany z hodowli bakterii *Pseudomonas aeruginosa* BI to ramnolipid, którego cząsteczka zawiera dwie cząsteczki ramnozy i 2 cząsteczki kwasu hydroksydekanowego (Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>). Na widmie masowym (Rys. 28) dominuje pik (649 m/z) reprezentujący masę molową ramnolipidu Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> [114]. W celu wyznaczenia krytycznego stężenia micelnarnego zbadano wpływ stężenia ramnolipidu na napięcie powierzchniowe (Rys. 29). Otrzymany ramnolipid obniżał napięcie powierzchniowe wody do 28,8 mN/m i posiadał CMC na poziomie 40 mg/l.



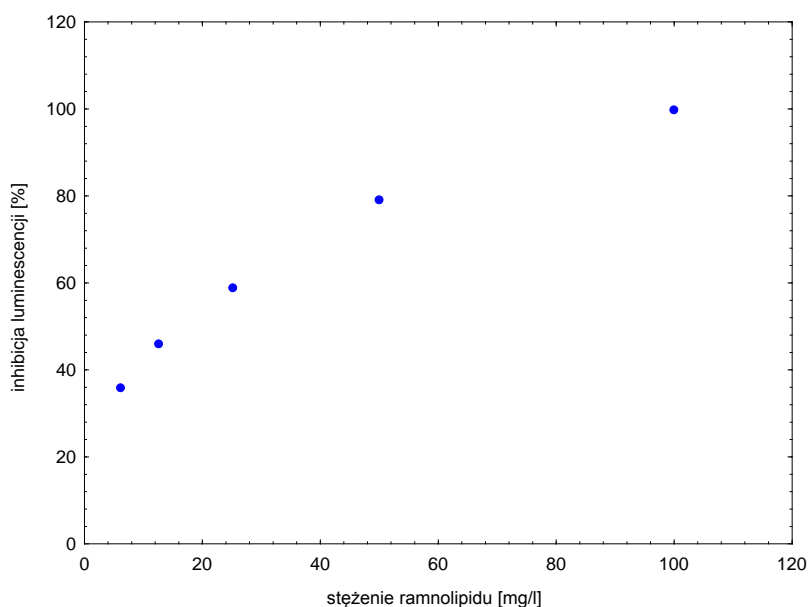
Rys. 28. Widmo masowe ramnolipidu.





Rys. 29. Zależność napięcia powierzchniowego roztworów ramnolipidu od stężenia.

Zaobserwowano wyraźny wpływ wodnych roztworów ramnolipidu na zdolność świecenia bakterii testowych. Stężenie ramnolipidu hamujące luminescencję bakterii testowych o 50% ( $EC_{50}$ ) wynosiło 20 mg/l (Rys. 30). Natomiast całkowite zahamowanie luminescencji bakterii testowych obserwowano przy stężeniu 100 mg/l. Ramnolipid Rha-Rha- $C_{10}$ - $C_{10}$  wyizolowany z hodowli *Pseudomonas aeruginosa* BI wykazywał nieco mniejszą toksyczość niż ramnolipid produkowany przez *Pseudomonas sp.* PS-17, dla którego  $EC_{50}$  wynosi 13 mg/l [179].



Rys. 30. Wpływ stężenia ramnolipidu na luminescencję bakterii *Vibrio fischeri*.

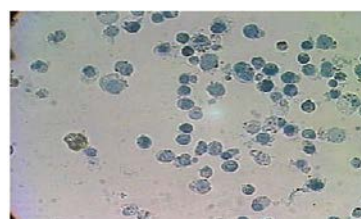
Badania cytotoksyczności wykazały, że ramnolipid Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> wykazywał cytotoksyczne działanie po 72 godzinach kontaktu z komórkami w stężeniu 31,2 µg/ml (Tab. 10). Ramnolipid Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> był 5 razy mniej cytotoksyczny w porównaniu z ramnolipidem produkowanym przez *Pseudomonas sp.* PS-17, dla którego stężenie powodujące degenerację komórek po 72 godzinach kontaktu wynosi 6,25 µg/ml [179].

Tab. 10. Cytotoksyczność wodnych roztworów ramnolipidu po 72 godz. kontaktu z komórkami Linii A549.

Stężenie ramnolipidu (mg/l)	Cytotoksyczność
2000	+
1000	+
500	+
250	+
125	+
62,5	+
31,25	-



1



2

Rys. 31. Obraz mikroskopowy komórek linii A549: 1 – komórki prawidłowe, 2 – komórki zdegenerowane.

## 6.7. WPLYW RAMNOLIPIDU NA STYMULACJĘ BIODEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH

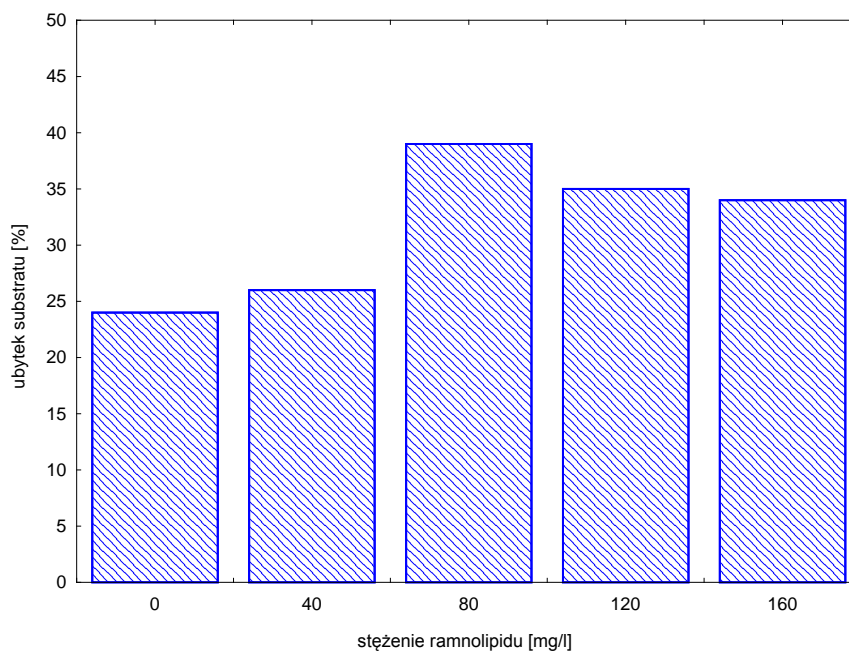
Biodegradacja wymaga pobrania substratu przez komórki, co z kolei wymaga kontaktu pomiędzy substratem i komórką. Kontakt jest określony przez dwa czynniki: dostępna powierzchnia substratu oraz powinowactwo komórek bakteryjnych do cząsteczek substratu. Biosurfaktanty powodują zwiększenie dyspersji lub powierzchni substratu dla mikrobiologicznego przyłączenia, które powinno skutkować wzrostem stopnia biodegradacji [139]. Dodatek surfaktantów wpływa na rozpuszczalność

węglowodorów oraz na wzajemne oddziaływania między węglowodorem oraz mikroorganizmem. Rozpuszczalność węglowodoru, szczególnie w bardzo małym nasyceniu fazy wodnej, potencjalnie może być jednym z czynników ograniczających proces biodegradacji. Dodatkowo surfaktanty mogą zmieniać zewnętrzną hydrofobową powierzchnię ściany komórkowej mikroorganizmu. Modyfikacja powierzchni ściany komórkowej może być realizowana poprzez adsorbcję surfaktantu na komórce bakterii lub może zwiększać przenikalność błony komórkowej. Hydrofobowość powierzchni szerokiego zakresu mikroorganizmów przypisywana jest obecności białek i tłuszczu w ścianie komórkowej. Dodatek związków powierzchniowo czynnych prawdopodobnie prowadzi do fenotypowych zmian w powierzchni mikroorganizmów podczas wzrostu. Tak więc hydrofobowość komórki bakteryjnej, będąca wynikiem powinowactwa komórek do zanieczyszczeń ropopochodnych, w obecności surfaktantów może ulegać zmianie [180]. Biosurfaktanty mogą zwiększać dyspersję słabo rozpuszczalnych organicznych związków na dwa sposoby. Po pierwsze zmniejszając napięcie powierzchniowe i międzyfazowe podłoża hodowlanego tym samym zwiększając dyspersję związków organicznych na poziomie molekularnym. Po drugie fizyczne oddziaływania biosurfaktantu z cząsteczkami słabo rozpuszczalnych związków organicznych zwiększają ich dyspersję – wzrost rozproszenia poniżej CMC spowodowany jest hydrofobowymi oddziaływaniami pomiędzy monomerami biosurfaktantu i cząsteczkami słabo rozpuszczalnych związków organicznych, natomiast wzrost rozproszenia powyżej CMC jest wywołany „kapsułkowaniem” cząsteczek tych związków wewnątrz micel lub dwuwarstwowych agregatów. Użycie biosurfaktantów jest atrakcyjne ze względu na to, iż są to produkty naturalne, biodegradowalne i potencjalnie mogą być stosowane *in situ* [176].

#### 6.7.1. WPŁYW STĘŻENIA RAMNOLIPIDU

Związki powierzchniowo czynne umożliwiają wzrost stopnia usunięcia zanieczyszczeń naftowych głównie poprzez zwiększenie ich rozpuszczalności. Solubilizacja hydrofobowych substancji rozpoczyna się przy stężeniu surfaktantu równym CMC, a potem jest funkcją liniową stężenia surfaktantu. Solubilizacja węglowodorów jest przypisywana łączeniu się cząsteczek hydrofobowych związków z hydrofobowymi rdzeniami micel w roztworze. Do określenia stężenia ramnolipidu

wyzolowanego z *Pseudomonas aeruginosa* BI powodującego największy wzrost stopnia biodegradacji frakcji destylacyjnych ropy naftowej wybrano zakres 40-160 mg/l. Najniższe stężenie badanego zakresu odpowiada wartości CMC ramnolipidu, a kolejne stężenia są jego wielokrotnością. Jain i in. [181] donoszą, że obecność ramnolipidu w stężeniu wyższym od CMC zwiększa biodegradację węglowodorów przez naturalnie występującą w badanej glebie populację mikroorganizmów, natomiast dodatek ramnolipidu w stężeniu poniżej CMC lub zaszczepienie prób gleby bakterią produkującą ramnolipid nie wpływa na biodegradację węglowodorów. Zbyt duże stężenie biosurfaktantu może zwiększyć solubilizację węglowodorów do takiego stopnia, w którym będą one toksycznie oddziaływać na mikroorganizmy. Ponadto niektóre biosurfaktanty mają działanie bakteriobójcze [159], dlatego stężenie wprowadzanego biosurfaktantu odgrywa znaczącą rolę w procesie biodegradacji produktów naftowych. W przeprowadzonych badaniach nad wpływem stężenia ramnolipidu wyizolowanego ze szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI stopień biodegradacji pozostałości po destylacji ropy naftowej rósł wraz ze stężeniem ramnolipidu, ale tylko do stężenia 80 mg/l (2 x CMC), przy którym ubytek substratu był największy (Rys. 32.). Powyżej tego stężenia zaobserwowano niewielkie zmniejszenie stopnia biodegradacji. Dodatek ramnolipidu w stężeniu 2 x CMC spowodował wzrost ubytku substratu o 10% w porównaniu do prób kontrolnych niezawierających ramnolipidu. Morán i in. [182] donoszą, że biosurfaktant produkowany przez *Bacillus subtilis* O9 w stężeniu powyżej CMC powoduje większy wzrost mikroorganizmów oraz zwiększenie biodegradacji węglowodorów alifatycznych z 20,9 % do 35,5 %, a także węglowodorów aromatycznych z 0 % do 41 % w porównaniu z próbami bez biosurfaktantu. Większość surfaktantów może powodować widoczny wzrost solubilizacji węglowodorów, jednakże stopień biodegradacji nie zawsze odpowiednio wzrasta. Prawdopodobnie dzieje się tak dlatego, że węglowodory solubilizowane w micelach nie od razu są dostępne dla mikroorganizmów. Surfaktanty grają dwie przeciwstawne role w biodegradacji substancji hydrofobowych – z jednej strony powodują wzrost transportu substratu do fazy wodnej, ale z drugiej strony węglowodory w micelach surfaktantów mogą być mniej dostępne w porównaniu z tymi prawdziwie rozpuszczonymi w fazie wodnej [183].



Rys. 32. Wpływ stężenia ramnolipidu na ubytek substratu.

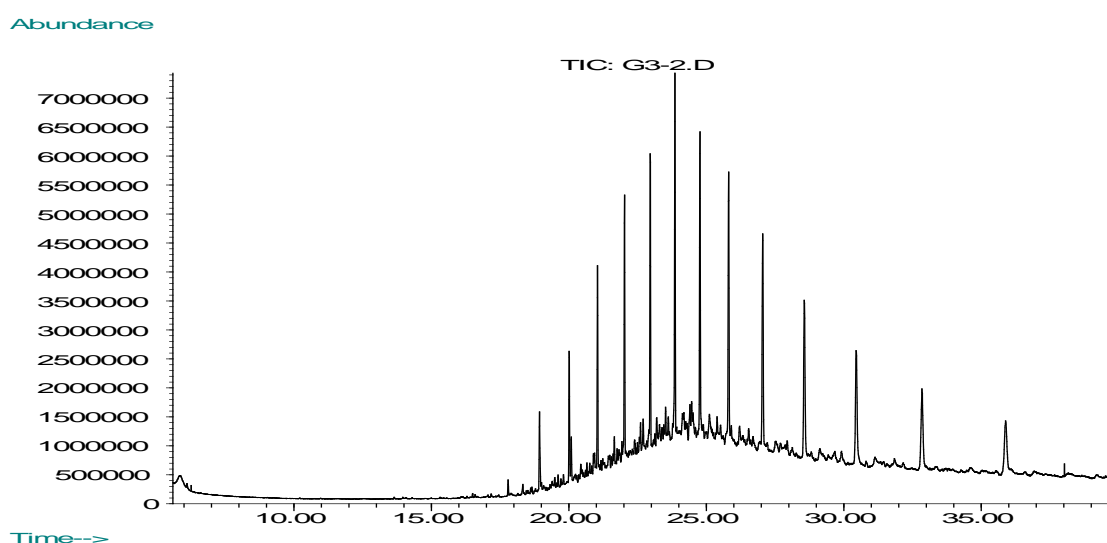
#### 6.7.2. WPŁYW STĘŻENIA I RODZAJU SUBSTRATU NA STYMULACJĘ PROCESU DEGRADACJI PRODUKTÓW NAFTOWYCH

Postęp procesu biodegradacji zależy od składu chemicznego produktów naftowych. Na podstawie analizy GC-MS okazało się, że ropa naftowa GROBLA zawierała węglowodory o liczbie atomów węgla  $C_7$ - $C_{30}$ . Wśród indywidualnych związków, zarejestrowanych na chromatogramie, największy udział miały n-alkany oraz izoparafiny, wśród których najwięcej było węglowodorów izoprenoidowych: pristanu (2,6,10,14-tetrametylopentadekan) i fitanu (2,6,10,14-tetrametyloheksadekan). W grupie węglowodorów cykloparafinowych w największych ilościach występowały n-alkilocykloheksany zawierające łańcuchy alifatyczne od  $C_2$  do  $C_{22}$ . W grupie jednopierścieniowych węglowodorów aromatycznych występował toluen i alkilowe pochodne benzenu zawierające podstawniki  $C_2$ - $C_4$ . Alkilobenzeny o dłuższych łańcuchach (zawierające do  $C_{15}$ ) występowały w znacznie mniejszych ilościach. Spośród WWA najwięcej było dwu- i trójpierścieniowych aromatów: naftalenu oraz  $C_1$  i  $C_2$  naftalenów, a także fenantrenu. Znacznie mniej było antracenu i czteropierścieniowych WWA. Nie było natomiast 5-ciopierścieniowych WWA, w tym benzo[a]pirenu. W badanej ropie naftowej zidentyfikowano związki heteroaromatyczne zawierające siarkę: dibenzotiofen oraz  $C_1$ ,  $C_2$  i  $C_3$  dibenzotiofeny.

Produkty naftowe są zróżnicowane pod względem składu chemicznego. Do badań nad wpływem rodzaju i stężenia substratu na proces biodegradacji zanieczyszczeń naftowych wybrano frakcję destylacyjną ropy naftowej o temperaturze wrzenia 180-350 °C (frakcja olejowa) oraz frakcję o temperaturze wrzenia powyżej 350 °C stanowiącą pozostałość po destylacji ropy naftowej (frakcja ciężka). Badane frakcje różniły się składem chemicznym oraz podatnością na biodegradację. Frakcja olejowa zawierała więcej składników bardziej podatnych na rozkład mikrobiologiczny niż frakcja ciężka. Natomiast biodegradacja frakcji ciężkiej była utrudniona ze względu na zawartość składników trudnobiodegradowalnych. Dokładną analizę składu chemicznego obu frakcji zawierają poniższe rozdziały.

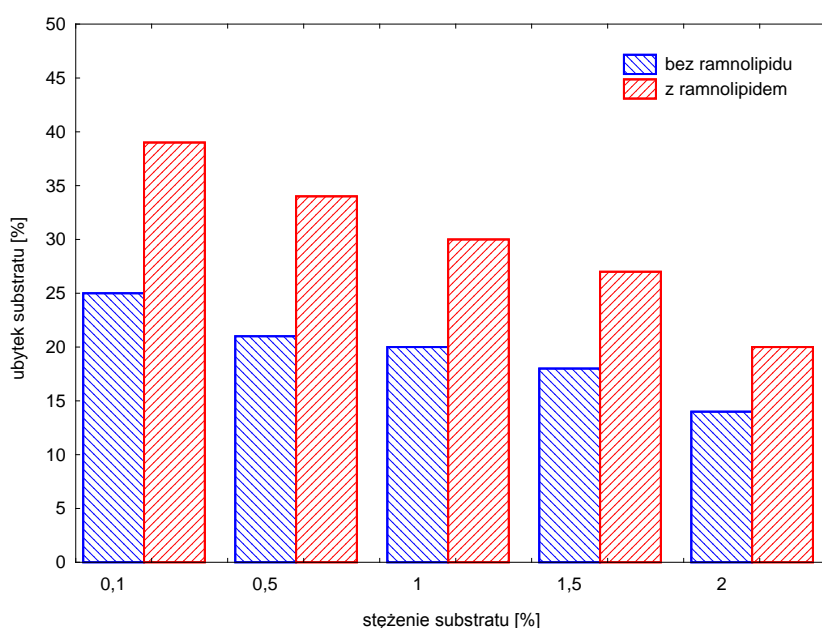
#### 6.7.2.1. BIODEGRADACJA FRAKCJI CIĘŻKIEJ

Analiza GC-MS wykazała, że frakcja ciężka była mieszaniną węglowodorów  $C_{17}$ - $C_{30}$ , w której głównymi indywiduami były n-alkany (Rys. 33). Wśród węglowodorów izoparafinowych najwięcej było fitanu, a w grupie cykloparafin-alkilocykloheksanów z podstawnikami o łańcuchach zawierających od 10 do 23 atomów węgla. Zidentyfikowano również obecność węglowodorów aromatycznych takich jak: alkilobenzeny z podstawnikami o długości łańcuchów od 10 do 21 atomów węgla, fenantren, antracen oraz czteropierścieniowe węglowodory aromatyczne. Głównym reprezentantem związków heteroaromatycznych był dibenzotiofen oraz jego alkilowe pochodne o łańcuchach od 1 do 3 atomów węgla.



Rys. 33. Chromatogram GC-FID frakcji ciężkiej ropy naftowej GROBLA.

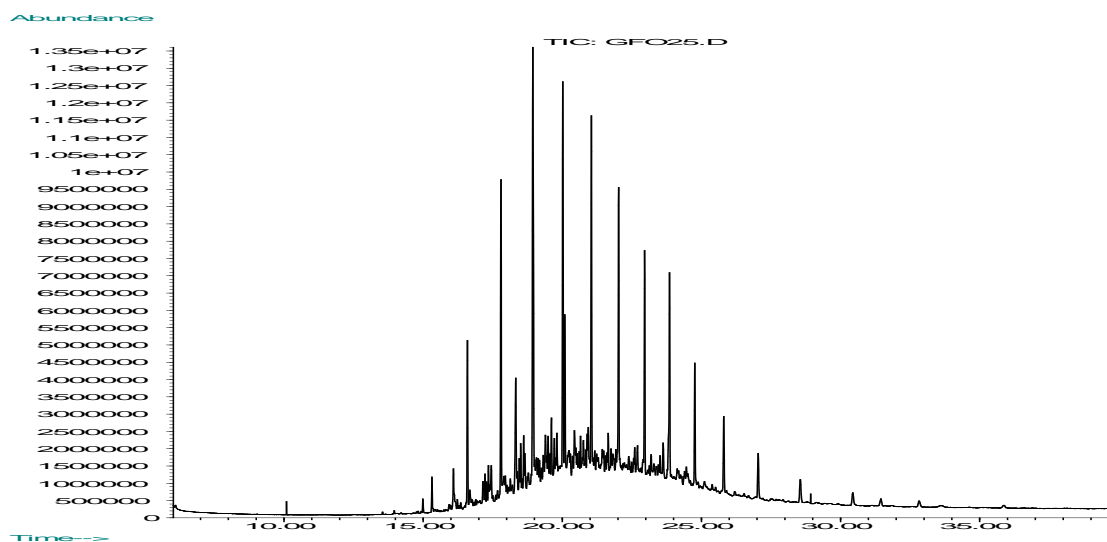
Wpływ ramnolipidu na skuteczność procesu biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej GROBLA oceniono w oparciu o analizę ubytku węglowodorów w hodowlach prowadzonych w obecności ramnolipidu w stężeniu 80 mg/l oraz bez ramnolipidu. Zbadano również wpływ stężenia substratu na skuteczność biodegradacji, ponieważ wiadomo, że węglowodory w odpowiednim stężeniu działają toksycznie na mikroorganizmy. Przeprowadzone badania potwierdziły pozytywny wpływ ramnolipidu wyizolowanego ze szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI na biodegradację ciężkiej frakcji ropy naftowej. Analiza wykazała, że skuteczność biodegradacji zależy od stężenia substratu. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia substratu stopień usunięcia węglowodorów zawartych we frakcji ciężkiej malał liniowo zarówno w hodowlach z ramnolipidem, jak i w tych bez ramnolipidu (Rys. 34). Wy tłumaczeniem tego zjawiska mogło być zbyt duże stężenie węglowodorów w stosunku do możliwości metabolicznych bakterii przeprowadzających biodegradację. Zwiększenie procentowego ubytku substratu podczas biodegradacji w obecności ramnolipidu widoczne było we wszystkich badanych stężeniach frakcji ciężkiej. Największy procentowy ubytek substratu zaobserwowano w hodowlach zawierających 0,1% substratu. Efekt ten był widoczny zarówno podczas biodegradacji frakcji ciężkiej w obecności ramnolipidu, jak i bez ramnolipidu. Największą stymulację biodegradacji zaobserwowano dla stężenia substratu 0,1 i 0,5%, która wyniosła odpowiednio 14 i 13%.



Rys. 34. Wpływ stężenia ciężkiej frakcji ropy naftowej na stopień biodegradacji.

### 6.7.2.2. BIODEGRADACJA FRAKCJI OLEJOWEJ

Analiza GC-MS wykazała, że frakcja olejowa była mieszaniną węglowodorów C<sub>8</sub>-C<sub>26</sub>, w której jako główne indywidua występowały przede wszystkim n-alkany i izoparafiny: pristan i fitan (Rys. 35). Obecne były również n-alkilocykloheksany zawierające podstawniki o łańcuchach od 2 do 18 atomów węgla. W grupie węglowodorów aromatycznych występowały alkilobenzeny z podstawnikami o długości łańcuchów C<sub>2</sub>-C<sub>15</sub>, głównie C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> oraz naftalen i jego alkilowe pochodne o łańcuchach zawierających 1-2 atomów węgla. We frakcji olejowej zidentyfikowano fenantren i czteropierścieniowe węglowodory aromatyczne oraz dibenzotiofen i jego pochodne zawierające łańcuchy od 1 do 3 atomów węgla.

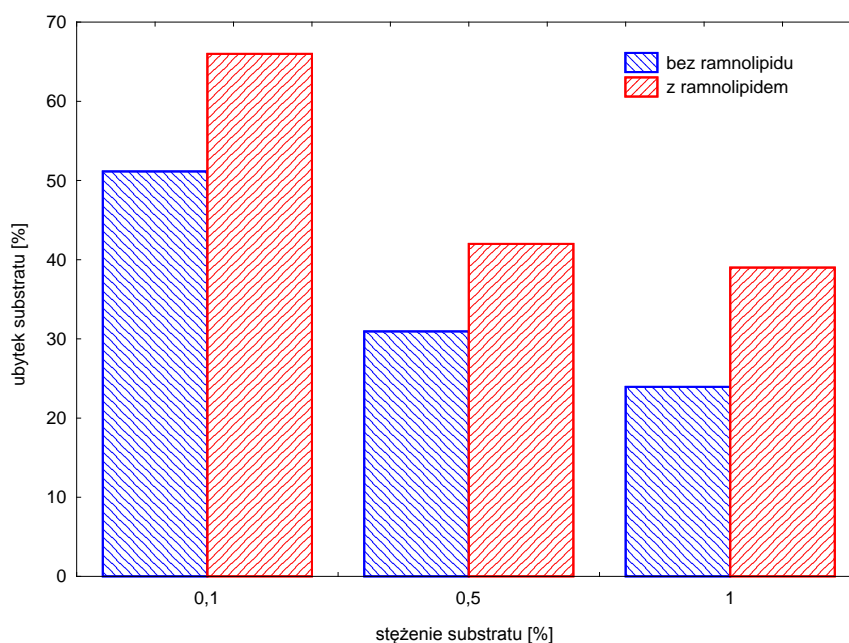


Rys. 35. Chromatogram GC-FID frakcji olejowej ropy naftowej GROBLA.

Wpływ ramnolipidu na skuteczność procesu biodegradacji frakcji olejowej ropy naftowej GROBLA oceniono w oparciu o analizę ubytku węglowodorów w hodowlach prowadzonych bez ramnolipidu oraz w obecności ramnolipidu w stężeniu 80 mg/l. Zbadano również wpływ stężenia substratu na skuteczność biodegradacji. Przeprowadzone badania potwierdziły pozytywny wpływ ramnolipidu wyizolowanego ze szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI na biodegradację frakcji olejowej ropy naftowej. Tak jak w przypadku ciężkiej frakcji ropy naftowej badania wykazały, że skuteczność biodegradacji zależy od stężenia substratu. Stopień usunięcia węglowodorów zawartych we frakcji olejowej malał liniowo wraz ze wzrostem stężenia substratu zarówno w hodowlach z ramnolipidem, jak i w tych bez ramnolipidu (Rys. 36). Zwiększenie procentowego ubytku substratu podczas biodegradacji w obecności



ramnolipidu widoczne było we wszystkich badanych stężeniach frakcji olejowej. Największy procentowy ubytek substratu zaobserwowano w hodowlach zawierających 0,1% substratu. Wynosił on 52% w hodowli bez ramnolipidu i 65% w hodowli z ramnolipidem. Otrzymane wyniki potwierdzają, że frakcja olejowa jest bardziej podatna na rozkład mikrobiologiczny niż frakcja ciężka. Ubytek frakcji olejowej podczas biodegradacji bez biosurfaktantu był dwa razy większy niż ubytek frakcji ciężkiej. W hodowli z ramnolipidem ubytek frakcji ciężkiej wynosił 39%, podczas gdy ubytek frakcji olejowej 65%. W dalszych badaniach skupiono się na biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej, ze względu na fakt, że jest to substrat trudnobiodegradowalny i w wyniku procesu biodegradacji uzyskuje się stosunkowo niewielki ubytek tego substratu.

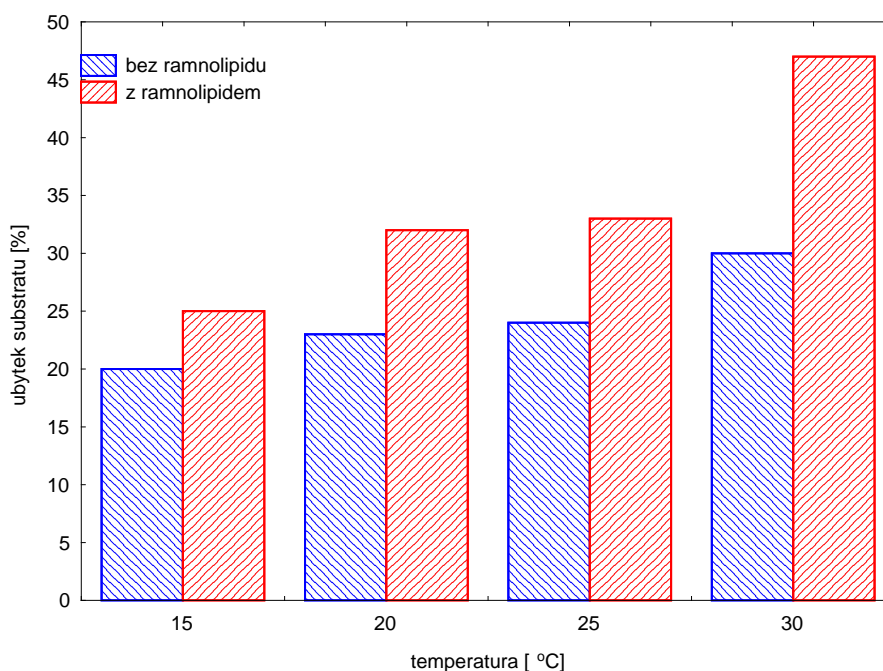


Rys. 36. Wpływ stężenia frakcji olejowej ropy naftowej na stopień biodegradacji.

### 6.7.3. WPLYW TEMPERATURY

Optymalna temperatura wzrostu mikroorganizmów autochtonicznych wynosi 20-25 °C. Przyjmuje się, że proces biodegradacji zanieczyszczeń naftowych przebiega efektywnie w temperaturze 15-45 °C [184]. Do badań nad wpływem temperatury na skuteczność biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej wybrano zakres 15-30 °C. Badania wykazały, że biodegradacja w zakresie temperatur 20-25 °C przebiegała z taką samą szybkością, osiągając ubytek substratu na poziomie 20% w hodowlach bez

ramnolipidu i ok. 30% w hodowlach z ramnolipidem. Podwyższenie temperatury do 30 °C skutkowało większą skutecznością biodegradacji, jednak taka temperatura nie jest naturalna dla środowiska w naszym klimacie. Z kolei obniżenie temperatury do 15 °C powodowało niewielki spadek skuteczności biodegradacji węglowodorów. Z przeprowadzonych badań wynika, że biodegradacja zachodziła w całym zakresie badanych temperatur tyle tylko, że z różną szybkością (Rys. 37). Stymulację biodegradacji poprzez zastosowanie ramnolipidu również obserwowano w całym zakresie temperatur. Najlepszy efekt tj. zwiększenie ubytku substratu o 18% uzyskano prowadząc proces w temperaturze 30 °C, a najmniejszy tj. zwiększenie ubytku substratu o 5% dla temperatury 15 °C. Temperatura odgrywa znaczącą rolę w procesie biodegradacji nie tylko ze względu na wpływ na wzrost mikroorganizmów, ale również dlatego, że rozpuszczalność substancji zależy od temperatury. W wyższej temperaturze rozpuszczalność produktów naftowych jest większa, co powoduje większą dostępność tych substancji dla drobnoustrojów.

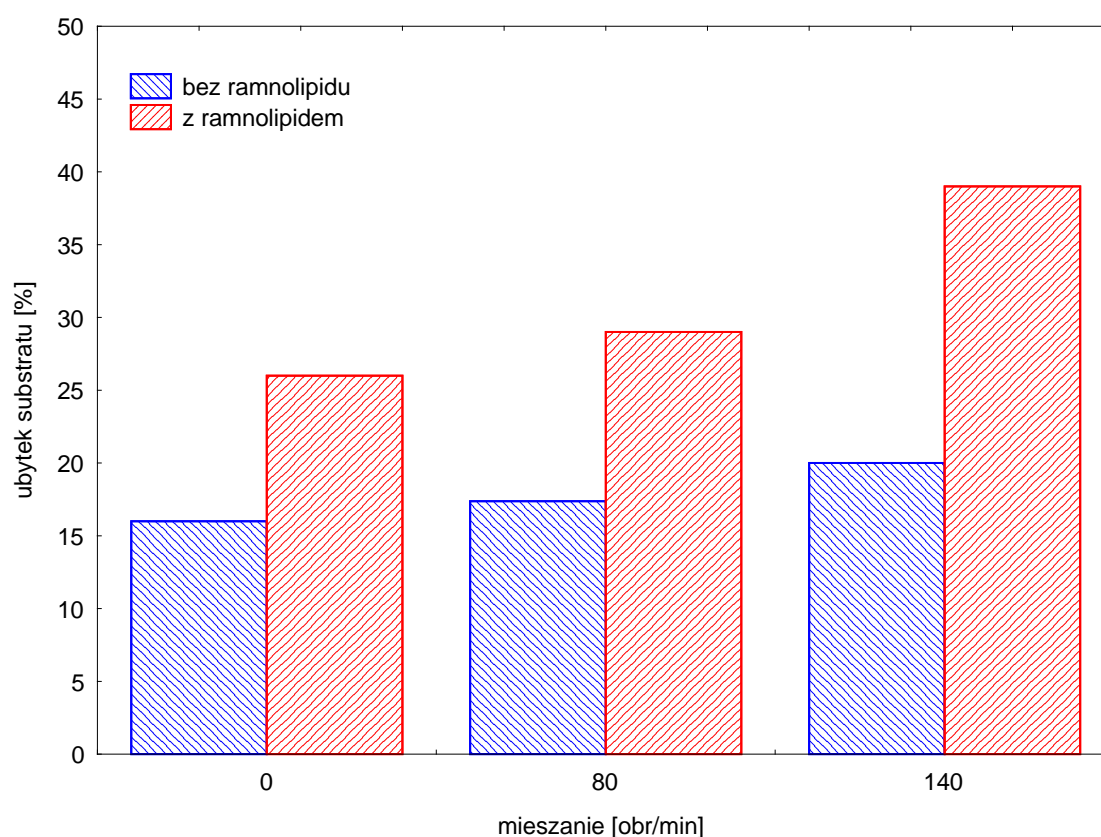


Rys. 37. Wpływ temperatury na biodegradację ciężkiej frakcji ropy naftowej Grobla.

#### 6.7.4. WPLYW NATLENIANIA

Proces natleniania hodowli jest czynnikiem warunkującym prawidłowy przebieg procesu biodegradacji w warunkach tlenowych. W roztworach wodnych substancje hydrofobowe jakimi są produkty naftowe utrzymują się na powierzchni tworząc

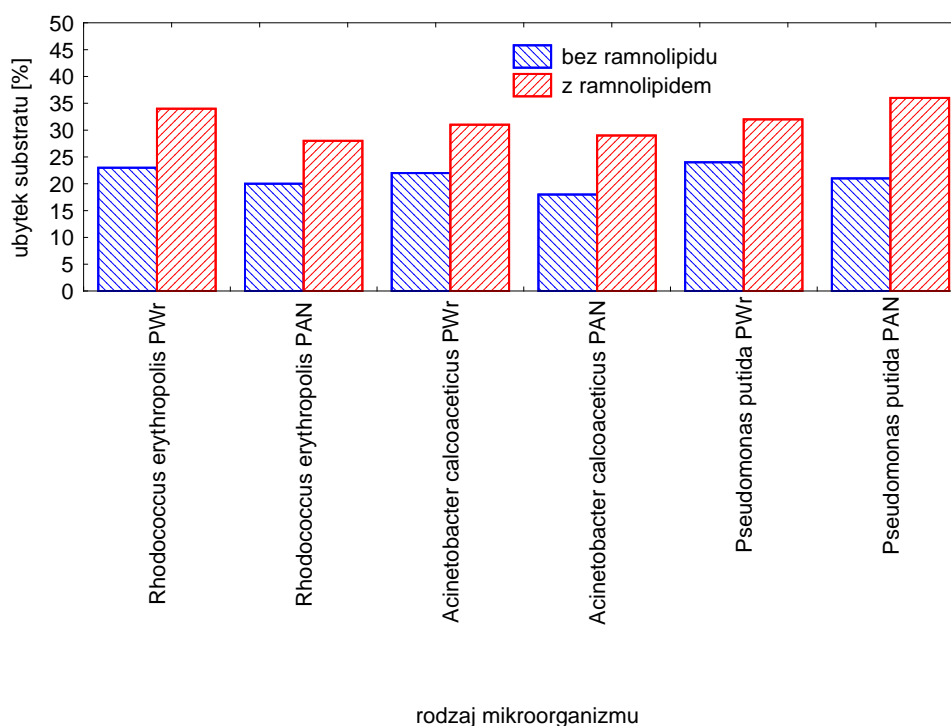
warstwę izolacyjną, która odcina dopływ powietrza. W procesie biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej natlenianie hodowli realizowano poprzez jej wytrząsanie z różną prędkością (0-140 obr/min). Analizowano wpływ prędkości wytrząsania na skuteczność biodegradacji. Zbyt duże wytrząsanie jest niebezpieczne dla mikroorganizmów, ponieważ silne uderzenia komórek o ściany kolb, mogą powodować ich śmierć. W hodowlach bez ramnolipidu zaobserwowano, że prędkość wytrząsania miała niewielki wpływ na przebieg procesu biodegradacji. Natomiast w hodowlach z dodatkiem ramnolipidu w stężeniu 80 mg/l wyraźnie widać, że prędkość wytrząsania ma znaczący wpływ na przebieg procesu biodegradacji. Ubytek substratu rósł proporcjonalnie do prędkości wytrząsania i osiągnął największą wartość tj. 40% kiedy hodowle wytrząsano z największą prędkością (Rys. 38). Wytrząsanie z prędkością 140 obr/min zapewniło bardzo intensywne napowietrzanie hodowli, ale również wzrost dyspersji substratu w podłożu hodowlanym. Ponadto wytrząsanie powodowało zwiększenie solubilizacji substratu naftowego w wyniku czego substrat był bardziej dostępny dla bakterii. Ubytek substratu w hodowlach wytrząsanych z prędkością 140 obr/min był największy.



Rys. 38. Wpływ napowietrzania na biodegradację ciężkiej frakcji ropy naftowej.

### 6.7.5. WPLYW RODZAJU MIKROORGANIZMÓW

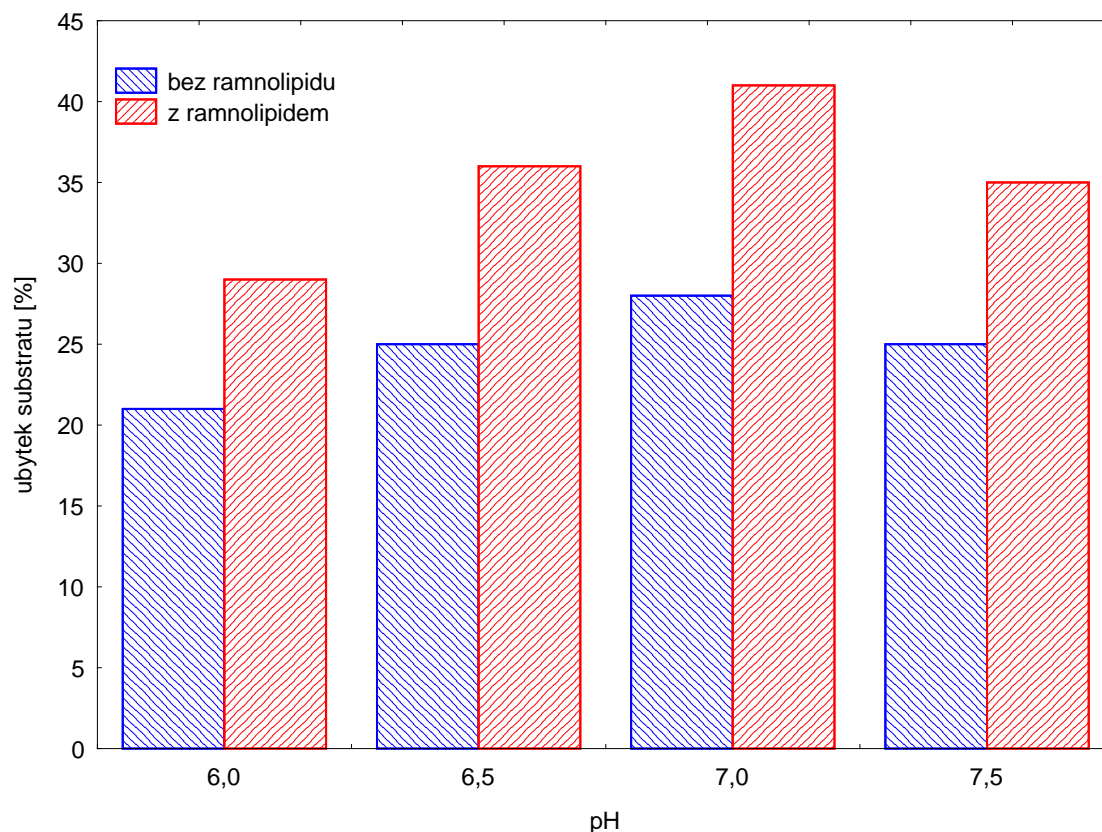
Drobnoustroje wytworzyły szereg mechanizmów ułatwiających im wykorzystywanie związków hydrofobowych w charakterze substratu pokarmowego. Jednym z nich jest zdolność do wytwarzania substancji obniżających napięcie powierzchniowe. Uruchomienie tych mechanizmów może przebiegać z inną szybkością u poszczególnych szczepów bakterii. Wprowadzenie ramnolipidu będzie stymulowało proces biodegradacji tylko u tych szczepów, które nie posiadają takich mechanizmów lub na ich uruchomienie potrzebują więcej czasu. Badania wykazały, że zarówno szczepy adaptowane jak i nieadaptowane skuteczniej rozkładały ciężką frakcję destylacyjną ropy naftowej w obecności ramnolipidu (Rys. 39). Podczas biodegradacji bez ramnolipidu w hodowlach ze szczepami adaptowanymi zaobserwowano większy ubytek substratu niż w hodowlach ze szczepami nieadaptowanymi. Natomiast podczas biodegradacji ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej w obecności ramnolipidu zaobserwowano większą skuteczność procesu w hodowlach ze szczepami nieadaptowanymi.



Rys. 39. Wpływ rodzaju mikroorganizmów na biodegradację ciężkiej frakcji ropy naftowej Grobla.

### 6.7.6. WPLYW PH

Optymalny odczyn środowiska dla większości mikroorganizmów posiadających zdolność wykorzystywania produktów naftowych w charakterze substratu pokarmowego mieści się w zakresie pH 5,5-8,0. Odczyn obojętny bliski pH 7,0 jest najkorzystniejszy. Do badań nad wpływem pH na skuteczność biodegradacji pozostałości po destylacji ropy naftowej wybrano zakres 6,-7,5. Jak wspomniano wcześniej ramnolipidy są związkami o charakterze anionowym i w zależności od pH w roztworach wodnych tworzą różne formy od lamelarnej przez pęcherzykową do micelarnej co wpływa na solubilizację węglowodorów i ich biodostępność. Również krytyczne stężenie micelarne ramnolipidów zależy od pH i jest niższe przy pH 4 niż przy pH 7 [185]. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że pH w badanym zakresie bardziej wpływało na przebieg procesu biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej w obecności ramnolipidu niż w hodowlach bez ramnolipidu. Zaobserwowano również, że zarówno w hodowlach z ramnolipidem jak i w hodowlach bez ramnolipidu ubytek substratu był największy dla pH=7 (Rys. 40) i wynosił odpowiednio 27 i 42%. Przy pH 7 ramnolipid występuje w postaci micel. Otrzymane wyniki badań wskazują, że węglowodory będące składnikami frakcji ciężkiej ropy naftowej solubilizowane w micelach były dostępne dla mikroorganizmów. Stąd największy ubytek substratu podczas biodegradacji w obecności ramnolipidu odnotowano przy pH 7. W hodowlach bez ramnolipidu również skuteczność biodegradacji była największa przy pH 7, co wskazuje, że dla mikroorganizmów rozkładających zanieczyszczenia naftowe z badanego zakresu jest to najbardziej odpowiednie pH. Shin i in. [186] badając wpływ pH na solubilizację fenantrenu w roztworze ramnolipidu o stężeniu 150 mg/l uzyskali największy ubytek substratu przy pH 5. Miller i in. [139,140] donoszą, że różne formy ramnolipidu, pomimo zwiększania rozpuszczalności oktadekanu, mogą wpływać na hydrofobowość komórek degradujących bakterii, prowadząc w jednym przypadku do stymulacji a w innym do hamowania biodegradacji.

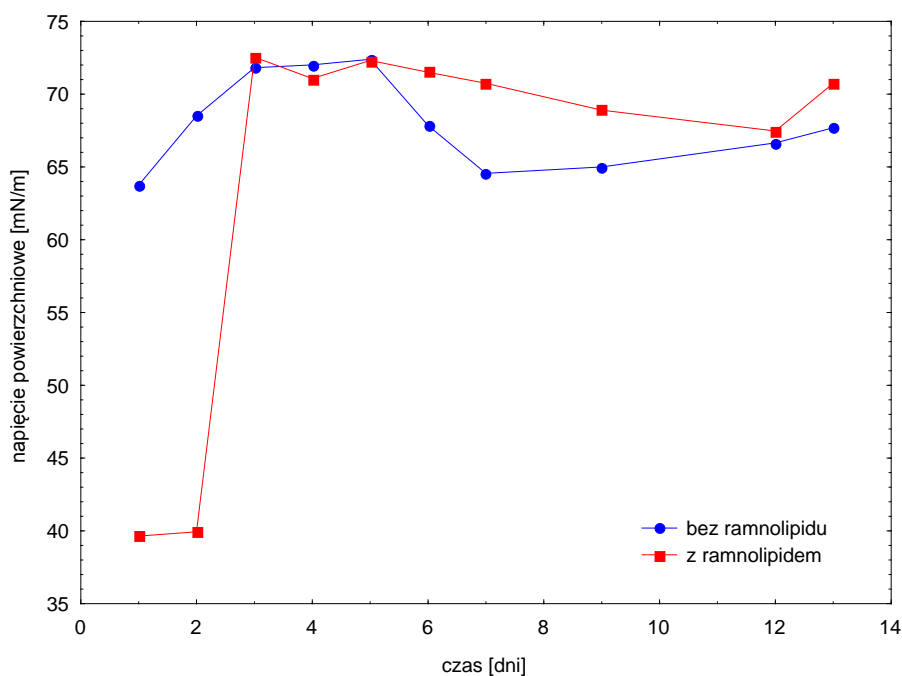


Rys. 40. Wpływ odczynu podłoża hodowlanego na biodegradację ciężkiej frakcji ropy naftowej Grobla.

## 6.8. ANALIZA SZYBKOŚCI PROCESU BIODEGRADACJI

W celu określenia roli ramnolipidu w toku procesu biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej przeprowadzono eksperyment, podczas którego oznaczano ogólną liczbę bakterii, napięcie powierzchniowe oraz liczbę i rozmiar kropeł ciężkiej frakcji ropy naftowej. Eksperyment prowadzono w dwóch wariantach: z ramnolipidem (80 mg/l) i bez ramnolipidu. W wariacie bez ramnolipidu zaobserwowano niewielkie zmiany napięcia powierzchniowego. W pierwszym dniu napięcie powierzchniowe było najniższe najprawdopodobniej z powodu wprowadzenia niewielkiej ilości biosurfaktantu podczas zaszczepiania hodowli. W kolejnych dniach nastąpił wzrost napięcia powierzchniowego spowodowany wykorzystaniem biosurfaktantu, a od 4 dnia bakterie zaczęły produkować swój biosurfaktant, efektem czego był niewielki spadek napięcia powierzchniowego. W wariacie z ramnolipidem zaobserwowano znaczny wzrost napięcia powierzchniowego świadczący o wykorzystywaniu ramnolipidu

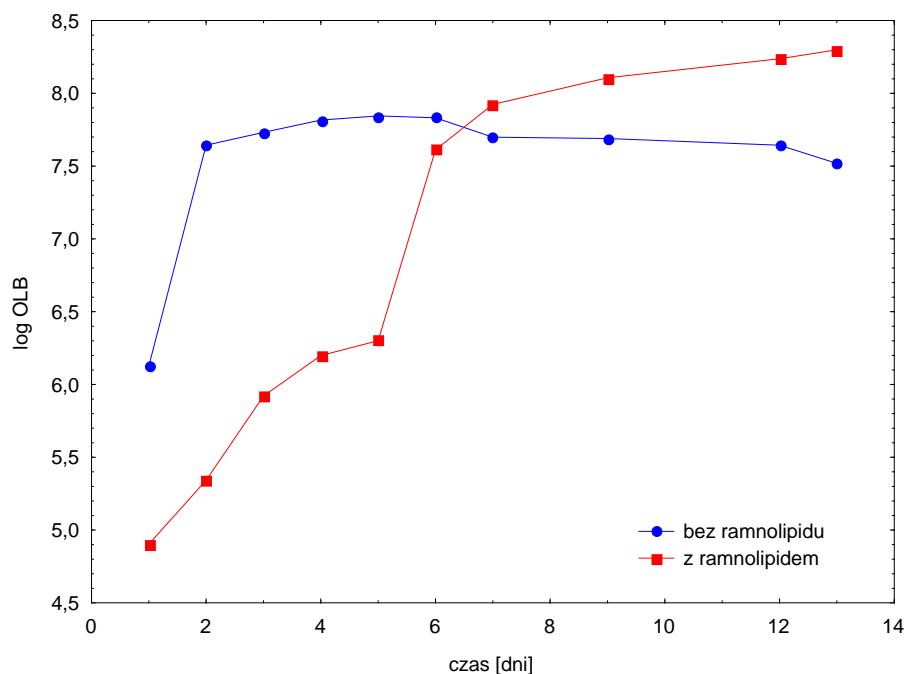
w charakterze źródła energii przez bakterie (Rys. 41). W trzecim dniu napięcie powierzchniowe hodowli z ramnolipidem osiągnęło wartość równą napięciu powierzchniowemu wody destylowanej, co oznaczało, że bakterie wykorzystały ramnolipid w charakterze substratu.



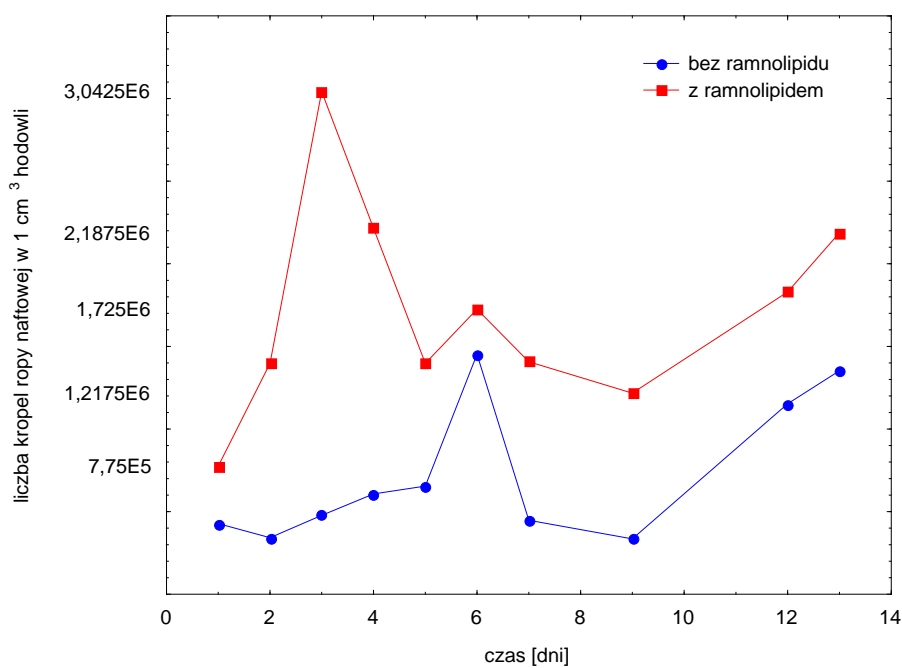
Rys. 41. Zmiana napięcia powierzchniowego podczas procesu biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej GROBLA z ramnolipidem i bez.

Analizując ogólną liczbę bakterii zaobserwowano, że w wariancie z ramnolipidem, pomimo całkowitego wykorzystania biosurfaktantu w ciągu 3 pierwszych dni, liczba bakterii rosła przez cały czas trwania eksperymentu, co świadczyło o biodegradacji węglowodorów, które od 3 dnia były jedynym substratem w hodowli. W wariancie bez ramnolipidu liczba bakterii stale rosła do 5 dnia, jednak znacznie wolniej niż w wariancie z ramnolipidem, a po 5 dniach – utrzymywała się na stałym poziomie (Rys. 42). Obserwacje te wskazują, że ramnolipid wpływał korzystnie na proces biodegradacji węglowodorów ciężkiej frakcji ropy naftowej poprzez obniżenie napięcia powierzchniowego hodowli i zwiększenie solubilizacji węglowodorów. W pierwszych 3 dniach eksperymentu zastosowany ramnolipid pełnił także rolę kosubstratu dla bakterii przeprowadzających biodegradację. W późniejszej fazie procesu bakterie uruchomiły własne mechanizmy ułatwiające im pobieranie hydrofobowego substratu. Potwierdza to analiza ilości kropeł ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej w 1 cm<sup>3</sup> hodowli (Rys. 43). Mniejszy przyrost liczby kropeł

ciężkiej frakcji ropy naftowej w doświadczeniu bez ramnolipidu wraz z mniejszym przyrostem mikroorganizmów wskazuje, że proces biodegradacji związków naftowych przebiegał wolniej w porównaniu do hodowli z ramnolipidem.



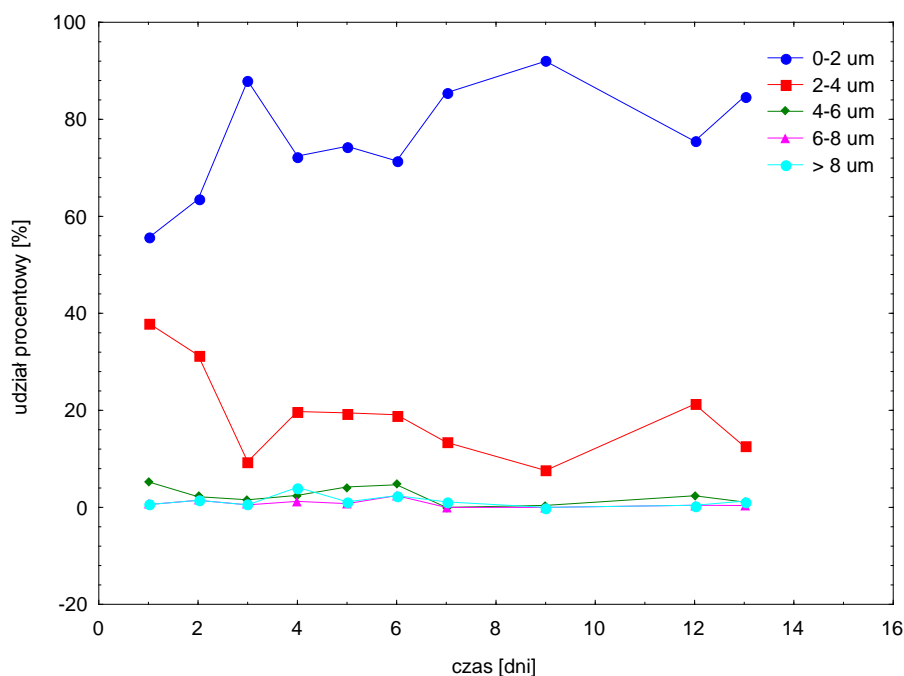
Rys. 42. Zmiana ogólnej liczby bakterii podczas procesu biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej GROBLA z ramnolipidem i bez.



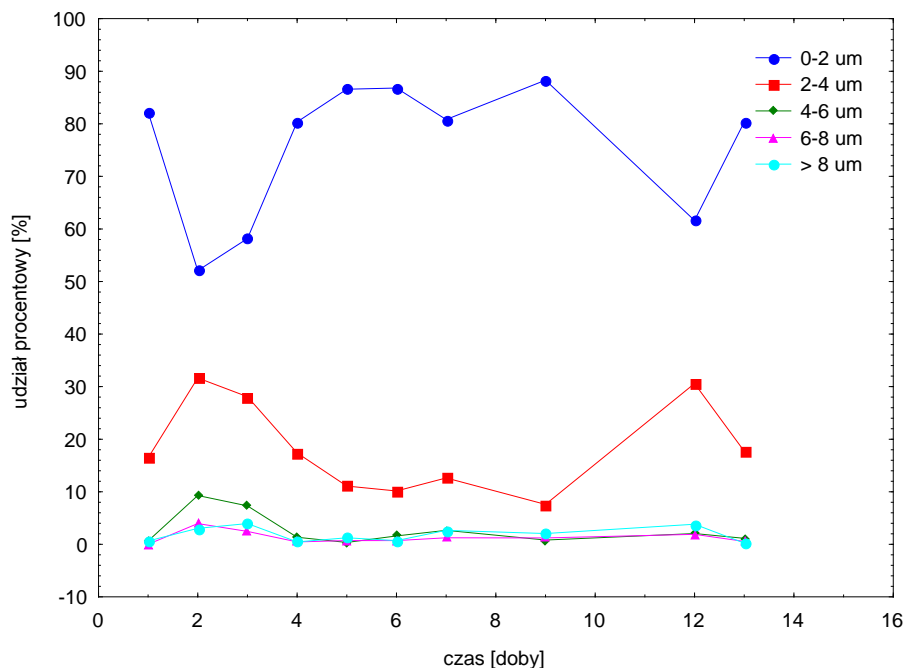
Rys. 43. Zmiana liczby kropeł ciężkiej frakcji ropy naftowej w 1 cm<sup>3</sup> hodowli z ramnolipidem i bez.



Zaobserwowano odwrotną zależność między liczbą kropeł a napięciem powierzchniowym. Obecność ramnolipidu podczas biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej wpłynęła wyraźnie na liczbę kropeł ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej szczególnie w pierwszych dniach eksperymentu. W późniejszej fazie zanotowano podobną liczbę kropeł w obu hodowlach. W hodowli bez ramnolipidu liczba kropeł substratu była mniejsza, ale wykazywała tendencję wzrostową. Odpowiedzialne za to było wytwarzanie przez bakterie własnych związków powierzchniowo czynnych, które ułatwiają solubilizację substancji hydrofobowych. Analiza rozkładu wielkości kropeł wykazała początkowo większy udział najmniejszych kropeł (o średnicy poniżej 2  $\mu\text{m}$ ) w hodowli z ramnolipidem (Rys. 45). Potwierdza to znaczącą rolę tego biosurfaktantu w procesie solubilizacji ropy naftowej. Duży udział najmniejszych kropeł w hodowli z ramnolipidem utrzymywał się stosunkowo krótko i w drugim dniu był mniejszy od procentowego udziału najmniejszych kropeł w hodowli bez ramnolipidu. Może to oznaczać, że ramnolipid był rozkładany przez bakterie, skutkiem czego był wzrost ich liczby. Od 3 dnia w obu hodowlach rozkład kropeł był zbliżony (Rys. 44 i 45). W obu hodowlach dominowały najmniejsze krople. Różnica polegała na tym, że w hodowli z ramnolipidem liczba kropeł była większa.



Rys. 44. Rozkład wielkości kropeł ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej w hodowli bez ramnolipidu.

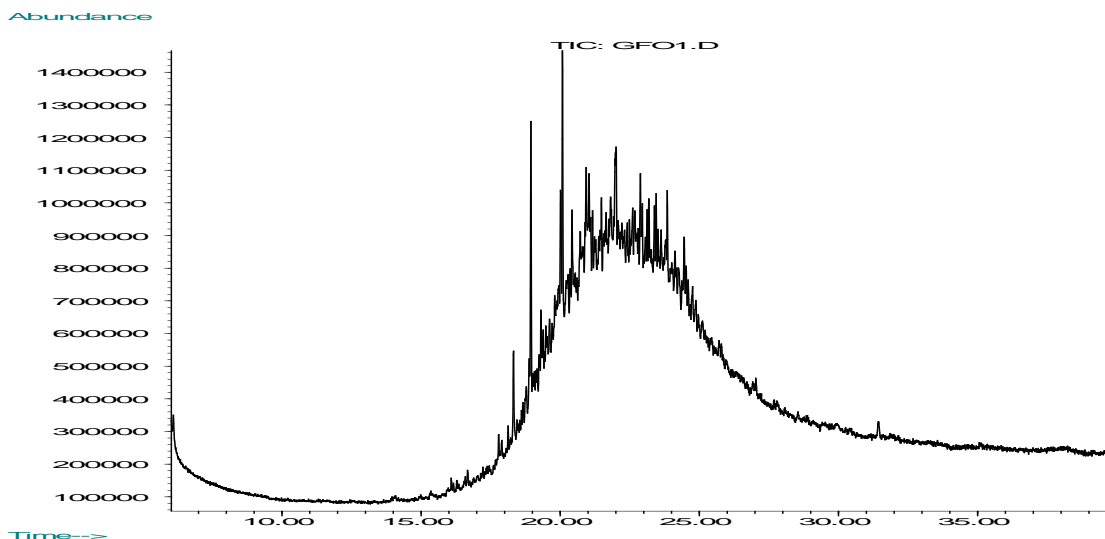


Rys. 45. Rozkład wielkości kropeł w hodowli z rhamnolipidem.

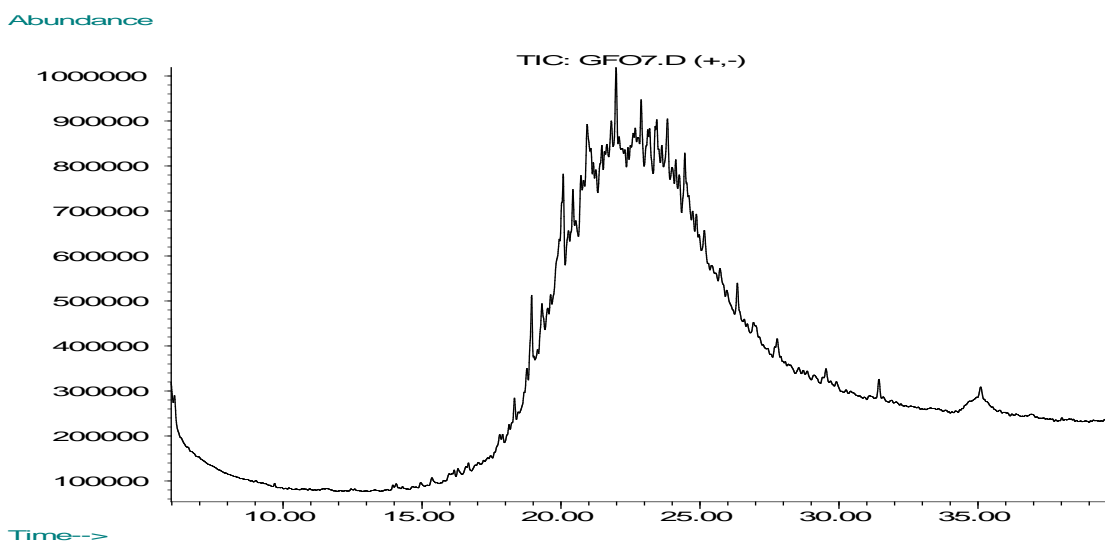
## 6.9. ANALIZA GC-MS POZOSTAŁOŚCI PO BIODEGRADACJI FRAKCJI DESTYLACYJNYCH ROPY NAFTOWEJ

Profil chromatograficzny produktów biodegradacji frakcji olejowej charakteryzował się nierozdzieloną powierzchnią chromatogramu w zakresie elucji węglowodorów  $C_{15}$ - $C_{26}$ , które występowały w próbce nie poddanej biodegradacji oraz obecnością nielicznych, rozdzielonych pików (Rys. 46). Głównymi indywidualami były węglowodory izoprenoidowe: pristan i fitan, których podatność na biodegradację była mniejsza niż n-alkanów. Podczas procesu usunięte również zostały n-alkilocykloheksany oraz w znacznym stopniu alkilobenzny. Trudno biodegradowalne były natomiast trój- i czteropierścieniowe WWA oraz dibenzotiofen i jego alkilowe pochodne. Produkty biodegradacji frakcji olejowej z rhamnolipidem charakteryzowały się podobnym profilem chromatograficznym do produktów biodegradacji bez rhamnolipidu. W wyniku procesu biodegradacji usunięte zostały n-alkany, n-alkilocykloheksany oraz w znacznym stopniu alkilobenzny. Dodatek rhamnolipidu nie przyczynił się do rozkładu trój- i czteropierścieniowych WWA oraz dibenzotiofenu i jego alkilowych pochodnych. Są to związki trudno biodegradowalne i prawdopodobnie przyczyną ich obecności w próbce po biodegradacji był brak

zdolności do rozkładu tego rodzaju związków przez badane konsorcjum mikroorganizmów. Dodatek ramnolipidu spowodował natomiast większy ubytek węglowodorów izoprenoidowych w tym pristanu i fitanu (Rys. 47).



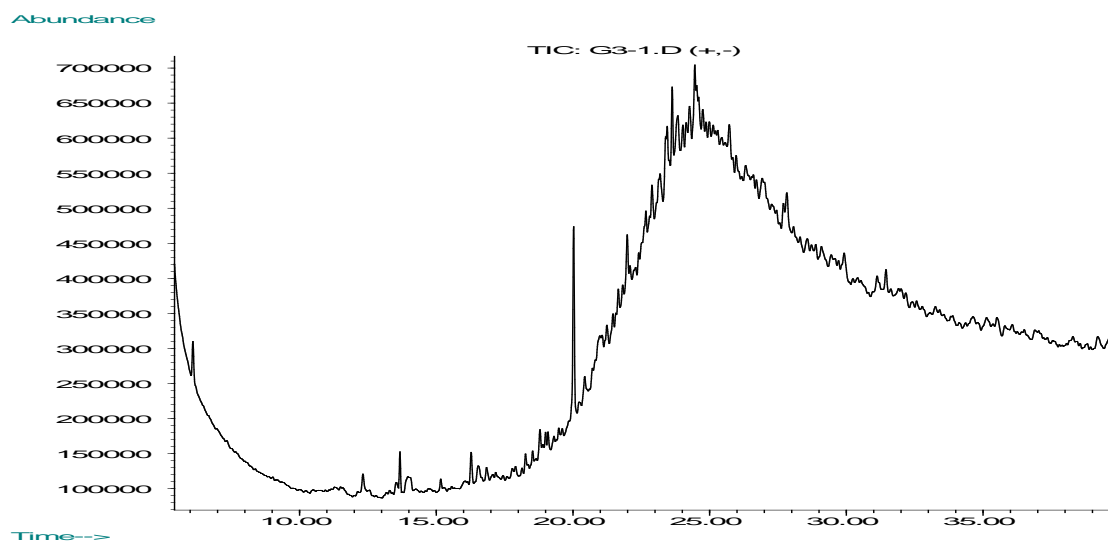
Rys. 46. Chromatogram GC-FID frakcji olejowej po biodegradacji bez ramnolipidu.



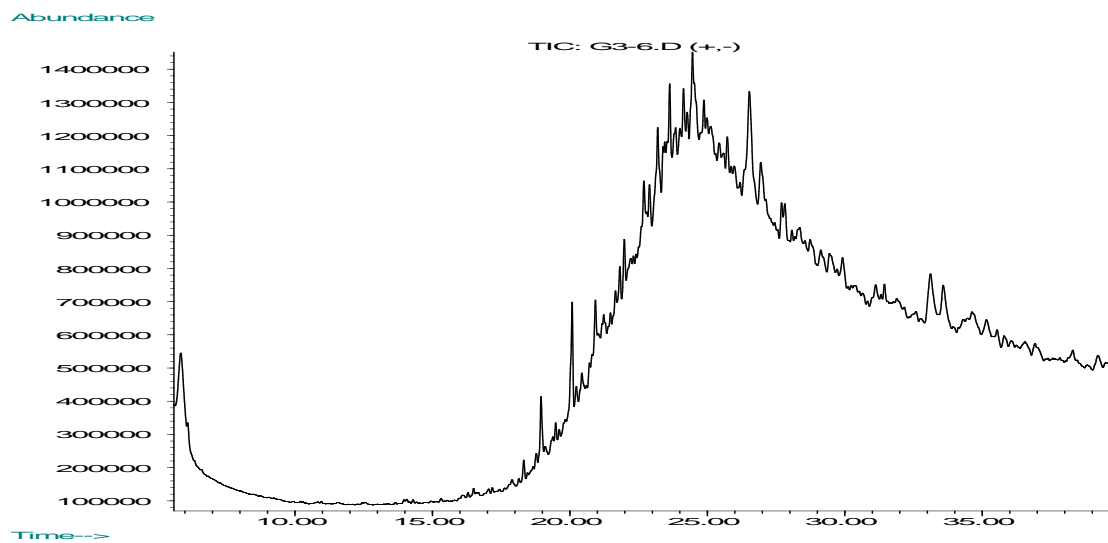
Rys. 47. Chromatogram GC-FID frakcji olejowej po biodegradacji z ramnolipidem.

Na chromatogramie produktów biodegradacji frakcji ciężkiej związki eluujące w zakresie  $C_{17}$ - $C_{30}$  tworzyły podniesioną linię podstawową, natomiast występujące na chromatogramie pojedyncze piki to zanieczyszczenia (ftalany) (Rys. 48). W procesie biodegradacji usunięte zostały n-alkany, fitan, alkilocykloheksany, natomiast pozostały niewielkie ilości alkilobenzenów. W znacznie mniejszym stopniu biodegradacji uległy trój- i czteropierścieniowe węglowodory aromatyczne oraz dibenzotiofen i jego alkilowe pochodne. Chromatogram produktów biodegradacji ciężkiej frakcji z ramnolipidem miał podobny profil do produktów biodegradacji bez ramnolipidu.

Dodatek ramnolipidu nie spowodował większego ubytku fitanu jak to miało miejsce podczas biodegradacji frakcji olejowej (Rys. 49).



Rys. 48. Chromatogram GC-FID frakcji ciężkiej po biodegradacji bez ramnolipidu.



Rys. 49. Chromatogram GC-FID frakcji ciężkiej po biodegradacji z ramnolipidem.

## 7. Dyskusja wyników

Biosurfaktanty produkowane są przez bakterie jako uboczny produkt metabolizmu. Proces otrzymywania biosurfaktantów przebiega z różną wydajnością, która między innymi wpływa na opłacalność produkcji. W literaturze mało jest informacji dotyczących strategii prowadzenia hodowli, które pozwoliłyby na zwiększenie wydajności otrzymywanego ramnolipidu. W niniejszej pracy zbadano wpływ podłoża mineralnego, temperatury i stężenia substratu na wydajność produkcji ramnolipidu przez szczep *Pseudomonas aeruginosa* BI. Wei zaproponował podłoże do produkcji ramnolipidów, którego skład został dobrany za pomocą wyliczeń matematycznych. Wg Wei hodowla *Pseudomonas aeruginosa* na tym podłożu prowadzi do otrzymania 3190 mg/l ramnolipidu. W badaniach nad produkcją ramnolipidu wykorzystano podłoże wg Wei jednak nie uzyskano zadowalającej wydajności. Więcej ramnolipidu otrzymano stosując podłoże mineralne wg Śiśkinej-Trocenko, które zawiera większość składników podłoża Wei jednak w innych proporcjach. Maksymalna wydajność jaką otrzymano była na poziomie 7000 mg/l. W charakterze substratu zastosowano glicerol [187, 188]. Stężenie glicerolu w badanym zakresie tj. 1-4% w niewielkim stopniu wpływało na wzrost produkcji ramnolipidu. Oznacza to, że substrat występował w hodowli w nadmiarze i mikroorganizmy nie były w stanie rozłożyć takiej jego ilości, dlatego nie warto stosować substratu w większych stężeniach niż 2%, gdyż zwiększa to tylko koszty produkcji a nie pozwala na uzyskanie większej ilości ramnolipidu. Z kolei temperatura miała znaczący wpływ na ilość otrzymanego ramnolipidu. Prowadzenie hodowli w temperaturze 22 °C nie wymaga dostarczania energii jak ma to miejsce podczas inkubowania w temperaturze 30 °C, ale wydajność produkcji ramnolipidu w temperaturze 22 °C jest prawie 2 razy mniejsza niż w temperaturze 30 °C i wynosi odpowiednio 4 i 7 g/l.

Ograniczeniem do stosowania biosurfaktantów są koszty ich produkcji spowodowane nie tylko niewielką wydajnością procesu otrzymywania ale również skomplikowanymi procedurami ich izolacji i oczyszczania. Pierwszym krokiem jest oddzielenie mikroorganizmów od podłoża pohodowlanego i na tym etapie często stosowaną metodą jest wirowanie. Otrzymany supernatant poddaje się dalszym procesom oczyszczania, jednak przeniesienie roztworu po wirowaniu bez ponownego zawieszenia niewielkich ilości bakterii jest praktycznie niemożliwe, w wyniku czego

bakterie namnażają się, co prowadzi do zanieczyszczenia biosurfaktantu już na samym początku ich izolacji. W niniejszej pracy zaproponowano rozwiązanie tego problemu poprzez zastosowanie technik membranowych. Badania wykazały wyższość procesu ultrafiltracji nad mikrofiltracją. Prowadząc separację mikroorganizmów na membranach mikrofiltracyjnych obserwowano spadek wydajności procesu spowodowany najprawdopodobniej zjawiskiem *foulingu*, który nie występował podczas oddzielania bakterii na membranach ultrafiltracyjnych. Parametry procesu dobrano eksperymentalnie badając wpływ prędkości przepływu, stężenia zawiesiny i ciśnienia na wydajność separacji. Uzyskano wydajność porównywalną z przepływem czystej wody. W przypadku separacji zawiesiny o stężeniu 2 g/l przy prędkości przepływu 1,5 m/s osiągnięto wydajność ponad 100 litrów z metra kwadratowego membrany w czasie 1 godziny procesu separacji.

Najczęstsze metody izolacji biosurfaktantów po oddzieleniu mikroorganizmów to strącanie kwasem i ekstrakcja rozpuszczalnikiem (octanem etylu, butanolem, pentanem, heksanem, mieszaniną chloroform-metanol lub dichlorometan-metanol). W literaturze można znaleźć też inne metody takie jak: adsorbcja na żywicach polistyrenowych lub na węglu aktywnym, chromatografia jonowymienna, selektywna krystalizacja czy frakcjonowanie piany. Metody te albo wymagają stosowania dużej ilości rozpuszczalników organicznych, w wyniku czego generują ogromną ilość odpadów, albo wymagają użycia specjalistycznego i drogiego sprzętu co negatywnie wpływa na całkowity koszt ich produkcji. Ponadto uzyskane biosurfaktanty nie zawsze charakteryzują się wymaganą czystością. W niniejszej pracy podjęto problem izolacji ramnolipidu z podłoża pochodowlanego proponując metodę dwustopniowej ultrafiltracji. W pierwszym etapie oczyszczono podłoże pochodowlane z zanieczyszczeń małocząsteczkowych takich jak sole mineralne, natomiast w drugim etapie usunięto wielkocząsteczkowe zanieczyszczenia takie jak białka. Największą wydajność (20 LMH) otrzymano stosując membranę z polietersulfonu o granicznej masie molowej 5 kDa. Proces prowadzono przy ciśnieniu 140 kPa. W drugim etapie ultrafiltracji istotne było określenie stężenia roztworu alkoholu, którym rozcieńczono retentat po pierwszym etapie oczyszczania oraz proporcji w jakich należało ten retentat mieszać z alkoholem. Badania wykazały, że 50% roztwór metanolu i 5-ciokrotne rozcieńczenie retentatu wystarcza by odzyskać ponad 90% ramnolipidu. Podobne wyniki otrzymali Lin i Jiang

[189] przy separacji surfaktyny. Otrzymany w wyniku dwustopniowej ultrafiltracji ramnolipid charakteryzował się krytycznym stężeniem micelarnym o wartości 40 mg/l i obniżał napięcie powierzchniowe do 28,6 mN/m. Inni autorzy otrzymali ramnolipidy o CMC 50 mg/l [190], 30 mg/l [191] i 28 mg/l [192].

Biosurfaktanty obniżają napięcie powierzchniowe, powodują dyspersję substancji hydrofobowych w roztworach wodnych oraz zwiększają solubilizację węglowodorów poprzez micelizację zwiększając ich biodostępność dla degradujących mikroorganizmów. Te właściwości wskazują na możliwość zastosowania naturalnych związków powierzchniowo czynnych do stymulacji biodegradacji produktów naftowych. Nie mniej jednak w literaturze znajdują się zarówno informacje o pozytywnym jak i negatywnym działaniu biosurfaktantów na proces biodegradacji produktów naftowych. Spowodowane jest to faktem, że wpływ surfaktantu na biologiczny rozkład węglowodorów zależy od struktury związku powierzchniowo czynnego, stanu fizycznego substratu, stopnia dyspersji i emulgowania węglowodoru oraz od rodzaju szczepu degradującego. W literaturze większość badań nad wpływem biosurfaktantów na biodegradację węglowodorów dotyczy pojedynczych związków. Natomiast problem zanieczyszczenia środowiska produktami naftowymi dotyczy bardzo skomplikowanych mieszanin węglowodorów takich jak ropa naftowa i produkty pochodzące z jej przeróbki. Produkty naftowe różnią się zawartością składników łatwo- i trudnobiodegradowalnych. Bardziej podatne na rozkład mikrobiologiczny są niskowrzące frakcje olejowe. Biodegradacja tych substancji zachodzi z dużym powodzeniem i nie wymaga stymulacji. Dlatego też do badań nad wpływem ramnolipidów na biodegradację produktów naftowych wybrano ciężką frakcję destylacyjną ropy naftowej, zawierającą substancje charakteryzujące się niską bioprzyswajalnością. Badania wykazały, że ramnolipid pozytywnie wpływa na biodegradację frakcji ropy naftowej przez mieszaną kulturę bakterii składającą się ze szczepów: *Rhodococcus erythropolis*, *Acinetobacter calcoaceticus* i *Pseudomonas putida*. Maksymalny ubytek substratu w obecności ramnolipidu był na poziomie 40% i był prawie 2 razy większy niż w hodowlach bez ramnolipidu, w których wynosił ok. 20%. Kaczorek i in. [180] uzyskali następujące wyniki stymulacji biodegradacji mieszaniny dodekanu i heksadekanu z użyciem ramnolipidu w stężeniu 150 mg/l: dla pojedynczych szczepów bakterii i drożdży: *Pseudomonas aeruginosa* TK 6%,

*Yarrowita lipolytica* EH 59 22%, *Candida maltosa* EH 60 23% a dla mieszanych kultur: *Pseudomonas aeruginosa* TK i *Yarrowita lipolytica* EH 59 22%, *Bacillus subtilis* i *Yarrowita lipolytica* EH 59 5%, *Pseudomonas aeruginosa* TK i *Candida maltosa* EH 60 1%, *Bacillus subtilis* i *Candida maltosa* EH 60 9%. Natomiast dla szczepu *Bacillus subtilis* zaobserwowali efekt hamujący na poziomie 14%. Śliwka i in. [193] uzyskali 35% wzrost wydajności procesu biodegradacji pozostałości po destylacji atmosferycznej olejowej frakcji ropy naftowej przez mieszaną kulturę: *Acinetobacter calcoaceticus* H29, *Rhodococcus erythropolis* H45, *Brevibacterium brevis* B1 przy stężeniu ramnolipidu 250 mg/l. Mulligan i in. [194] donoszą, że ramnolipid w stężeniu 300 mg/l powoduje wzrost mineralizacji oktadekanu z 5 do 20% w porównaniu z kontrolą.

Wpływ na otrzymane w badaniach wyniki miały warunki prowadzenia procesu. Pierwszym istotnym parametrem było stężenie ramnolipidu. Zbyt wysokie stężenie biosurfaktantu może zwiększyć solubilizację węglowodorów do takiego stopnia, w którym będą one toksycznie oddziaływać na mikroorganizmy. W niniejszej pracy największą stymulację biodegradacji frakcji ropy naftowej zaobserwowano stosując ramnolipid w stężeniu dwukrotnie wyższym od CMC czyli 80 mg/l. Jain i in. [181] donoszą, że ramnolipid w stężeniu wyższym od CMC zwiększa biodegradację węglowodorów przez naturalnie występującą w badanej glebie populację mikroorganizmów, natomiast w stężeniu poniżej CMC lub po zaszczerpieniu prób gleby bakterią produkującą ramnolipid nie wpływa na biodegradację węglowodorów. Kolejnym parametrem mającym wpływ na przebieg procesu biodegradacji produktów naftowych jest ich skład chemiczny oraz stężenie. Węglowodory jednopierścieniowe o stosunkowo wysokiej rozpuszczalności w wodzie takie jak benzen, toluen, etylobenzen i ksylen oraz dwupierścieniowe takie jak bifenyl czy naftalen posiadają właściwości bakteriobójcze. Naftalen o stężeniu nawet już 5 mg/l może być toksyczny dla bakterii rozkładających WWA [195]. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że olejowa frakcja destylacyjna ropy naftowej jest bardziej podatna na biodegradację. W hodowlach, w których substratem była ciężka frakcja destylacyjna ropy naftowej uzyskano mniejszy ubytek substratu niż w hodowlach z substratem w postaci olejowej frakcji destylacyjnej ropy naftowej, odpowiednio 25% i 52% podczas biodegradacji bez ramnolipidu oraz 39% i 65% w obecności ramnolipidu. Przedstawione wartości ubytku



olejowej i ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej uzyskano kiedy stężenie substratu było najmniejsze z badanego zakresu czyli 0,1%. Przy większych stężeniach substratu jego ubytek był proporcjonalnie mniejszy.

Ramnolipidy są biosurfaktantami anionowymi i w zależności od pH tworzą różne formy od lamelarnej przez pęcherzykową do micelarnej co wpływa na solubilizację węglowodorów i ich biodostępność. Również krytyczne stężenie micelarne zależy od pH i jest niższe w pH 4 niż w pH 7 [196]. W badaniach nad stymulacją biodegradacji produktów naftowych w obecności ramnolipidu uzyskano najlepszy efekt przy pH 7 co sugeruje, że węglowodory solubilizowane w micelach są w takich warunkach dostępne dla rozkładających je mikroorganizmów a odczyn podłoża jest dla nich odpowiedni. Shin i in. [197] zbadali wpływ pH na solubilizację fenantrenu w roztworze ramnolipidu o stężeniu 150 mg/l uzyskując najlepszy efekt przy pH 5. Miller i in. [138, 139] wykazali, że różne formy ramnolipidu, pomimo zwiększania rozpuszczalności oktadekanu, mogą wpływać na hydrofobowość komórek degradujących bakterii, prowadząc w jednym przypadku do stymulacji a w innym do hamowania biodegradacji. Określono również wpływ temperatury i natleniania na przebieg procesu biodegradacji. Proces biodegradacji zachodził w całym badanym zakresie temperatur, tj. 15-30 °C co jest szczególnie ważne biorąc pod uwagę zmiany temperatur w środowisku. Stymulację biodegradacji poprzez zastosowanie ramnolipidu również obserwowano w całym zakresie temperatur. Najlepszy efekt tj. zwiększenie ubytku substratu o 18% uzyskano prowadząc proces w temperaturze 30 °C, a najmniejszy tj. zwiększenie ubytku substratu o 5% dla temperatury 15 °C. Temperatura odgrywa znaczącą rolę w procesie biodegradacji nie tylko ze względu na wpływ na wzrost mikroorganizmów, ale również dlatego, że rozpuszczalność substancji zależy od temperatury. W wyższej temperaturze rozpuszczalność produktów naftowych jest większa, co powoduje większą dostępność tych substancji dla drobnoustrojów. Okazało się również, że wytrząsanie hodowli z prędkością 140 obr/min zapewniło dostateczne jej natlenienie oraz wzrost dyspersji substratu w podłożu hodowlanym. Skutkiem tego było zwiększenie bioprzyswajalności węglowodorów zawartych w ciężkiej frakcji destylacyjnej ropy naftowej. Z w/w powodów ubytek substratu w hodowlach wytrząsanych z prędkością 140 obr/min był największy i wyniósł 38%. Związki powierzchniowo czynne mogą zwiększać skuteczność procesu biodegradacji

substancji hydrofobowych poprzez obniżanie napięcia powierzchniowego, zwiększenie rozpuszczalności tych substancji, prowadząc do wzrostu ich bioprzyswajalności. Analiza roli ramnolipidu w procesie biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej wykazała, że ramnolipid w pierwszych dniach eksperymentu pełnił rolę kosubstratu dla mikroorganizmów przeprowadzających biodegradację produktów naftowych. Dodanie biosurfaktantu przyspieszało pierwszą fazę procesu, skracając okres adaptacji mikroorganizmów w porównaniu do prób bez ramnolipidu, podobnie jak donoszą Benincasa i in. [198]. Analiza chromatograficzna wykazała, że w procesie biodegradacji olejowej frakcji ropy naftowej zostały usunięte n-alkany, n-alkilocykloheksany oraz w znacznym stopniu alkilobenzeny. Zaobserwowano obecność węglowodorów izoprenoidowych, głównie pristanu i fitanu, które są mniej podatne na biodegradację niż n-alkany. W niewielkim stopniu biodegradacji uległy trój- i czteropierścieniowe WWA oraz dibenzotiofen i jego alkilowe pochodne. Chromatogramy próbek z ramnolipidem i bez ramnolipidu charakteryzowały się podobnym profilem co wskazuje na niewielką różnicę produktów biologicznego rozkładu. Dodatek ramnolipidu spowodował większy ubytek pristanu i fitanu. Analiza jakościowa prób po biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej wskazuje na usunięcie n-alkanów, izoprenoidów w tym fitanu oraz alkilocykloheksanów. Natomiast pozostały niewielkie ilości alkilobenzenów. W znacznie mniejszym stopniu biodegradacji uległy trój- i czteropierścieniowe WWA oraz dibenzotiofen i jego alkilowe pochodne. Porównanie chromatogramów prób po biodegradacji frakcji ciężkiej w obecności ramnolipidu oraz bez ramnolipidu wykazało negatywny wpływ ramnolipidu na biodegradację fitanu.

## 8. WNIOSKI

1. Szczep *Pseudomonas aeruginosa* BI posiada zdolność wytwarzania związków powierzchniowo czynnych.
2. Biosurfaktant wyizolowany ze szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI to ramnolipid, którego cząsteczka składa się z dwóch cząsteczek ramnozy i dwóch cząsteczek kwasu hydroksydekanowego. Wyizolowany ramnolipid charakteryzuje się wysoką aktywnością powierzchniową: obniża napięcie powierzchniowe roztworów wodnych do 28,8 mN/m, a jego krytyczne stężenie micelarne wynosi 40 mg/l. Otrzymany ramnolipid Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub> charakteryzuje się niską toksycznością i cytotoksycznością.
3. Szczep *Pseudomonas aeruginosa* BI wytwarza najwięcej ramnolipidu na podłożu wg Śiśkinej-Trocenko w temperaturze 30 °C.
4. Ultrafiltracja jest właściwą metodą do oddzielania bakterii od podłoża hodowlanego w procesie otrzymywania biosurfaktantów. Odpowiednio dobrana membrana pozwala uniknąć blokowania porów i uzyskać wysoką wydajność separacji. Zastosowanie membrany kapilarnej o MWCO 100 kDa wykonanej z polisulfonu pozwoliło na uzyskanie następujących strumieni krytycznych: podczas separacji zawiesiny o stężeniu 1 g/l i prędkościach przepływu 0,5; 1 i 1,5 m/s odpowiednio 70, 110 i 130 LMH; podczas separacji zawiesiny o stężeniu 2 g/l odpowiednio 50, 80 i 110 LMH; natomiast podczas separacji zawiesiny o stężeniu 4 g/l odpowiednio 35, 50 i 80 LMH.
5. Izolacja ramnolipidu z zastosowaniem dwustopniowego procesu ultrafiltracji jest metodą ekonomiczną i przyjazną środowisku, która pozwala na uzyskanie ramnolipidu o większej czystości w porównaniu z ramnolipidem otrzymywanym z wykorzystaniem ekstrakcji octanem etylu.
6. Ramnolipid wytwarzany przez szczep *Pseudomonas aeruginosa* BI stymuluje biodegradację skomplikowanych mieszanin węglowodorów jakimi są frakcje ropy naftowej otrzymane w procesie destylacji. W przypadku frakcji olejowej można uzyskać zwiększenie wydajności biologicznego rozkładu przez mieszaną

kulturę bakterii: *Rhodococcus erythropolis*, *Acinetobacter calcoaceticus* i *Pseudomonas putida* o 13% a dla frakcji ciężkiej o 19%. Zastosowanie ramnolipidu do biodegradacji ciężkiej frakcji ropy naftowej pozwala usunąć prawie 2 razy więcej węglowodorów.

7. Kluczowymi parametrami mającym wpływ na powodzenie stosowania ramnolipidów do stymulacji biodegradacji produktów naftowych jest stężenie biosurfaktantu oraz stężenie substratu, które trzeba ustalić eksperymentalnie przed przystąpieniem do usuwania hydrofobowych zanieczyszczeń metodą biologicznego rozkładu wspomaganego biosurfaktantami.

## 9. LITERATURA

- [1] BP Statistical Review of World Energy June 2008,  
[www.bp.com/statisticalreview](http://www.bp.com/statisticalreview)
- [2] Fąfara Z. i inni, Metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych ze środowiska gruntowo-wodnego: praca zbiorowa pod redakcją Stanisława Rychlickiego, AGH Uczelniane Wydawnictwo Naukowo-Dydaktyczne, Kraków 2006.
- [3] Mastalerz P., Chemia organiczna, Wydawnictwo Chemiczne, Wrocław 2000.
- [4] Bugaj C. i in., Ropa naftowa: właściwości, przetwarzanie, produkty: praca zbiorowa / pod redakcją J. Surygały, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2006
- [5] Kaliski M., Staško D., Charakterystyka energetyczna użytkowania paliw kopalnych, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 19/2 (2002) 383-392
- [6] Karta charakterystyki produktu Polskiego Koncernu Naftowego Orlen S.A.: Benzyny silnikowe bezołowiowe ES 95, ES 95A, ES 95E, SUPER PLUS 98, VERVA 98
- [7] Karta charakterystyki produktu Polskiego Koncernu Naftowego Orlen S.A.: Olej napędowy Ekodiesel ULTRA B,D,F; Olej Napędowy Miejski Super; VERVA ON
- [8] Karta charakterystyki produktu Polskiego Koncernu Naftowego Orlen S.A.: Olej opałowy lekki EKOTERM PLUS
- [9] Karta charakterystyki GL 61 produktu Grupy Lotos S.A.: Paliwo lotnicze Jet A-1, Paliwo lotnicze F-34, Paliwo lotnicze F-35
- [10] Surygała J., Śliwka E., Wycieki ropy i produktów naftowych, W: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie: praca zbiorowa pod redakcją Jana Surygały, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000.
- [11] Surygała J., Właściwości produktów naftowych, W: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie: praca zbiorowa pod redakcją Jana Surygały, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000.
- [12] Macuda J., Procyk B., Rogowska-Kwas R., Zawisza L., Redukcja zanieczyszczeń węglowodorowych ze środowiska wodnego przy wykorzystaniu szkła porowatego, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 21/1 (2004) 239-245

- [13] Gromek A., Raport o występowaniu zdarzeń o znamionach poważnej awarii w 2007 roku, Raport GIOŚ, Warszawa 2008
- [14] Kołwzan B., Śliwka E., Macuda J., Surygała J., Ocena biodegradowalności zanieczyszczeń naftowych w odpadach wiertniczych, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 19/2 (2002) 393-401
- [15] Solecki T., Macuda J., Metody wykrywania i identyfikacji substancji ropopochodnych w środowisku gruntowo-wodnym, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 21/1 (2004) 325-332
- [16] Fabisiak J., Zagrożenia ekologiczne Bałtyku związane z zanieczyszczeniami chemicznymi – węglowodory, *Zeszyty Naukowe Akademii Marynarki Wojennej Rok XLIX Nr 3/174* (2008) 7-28
- [17] Macuda J., Ocena stanu środowiska gruntowego w rejonie instalacji magazynowania i regeneracji olejów, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 25/2 (2008) 483-488
- [18] Siuta J., Ekologiczne, technologiczne i prawne aspekty rekultywacji gruntów zanieczyszczonych produktami ropy naftowej, W: *Technologie odolejania gruntów, odpadów, ścieków*, Inżynieria Ekologiczna Nr 8, Wydawnictwo Naukowe Gabriel Borowski, Warszawa 2003
- [19] Steliga T., Kluk D., Analiza przebiegu procesu biodegradacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie z wykorzystaniem chromatografii gazowej, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 21/1 (2004) 349-357
- [20] Różański H., *Skutki oddziaływania zanieczyszczeń ropopochodnych na środowisko przyrodnicze*, Poznań 2001, <http://luskiewnik.webpark.pl/luskiewnik.naftofit.html>
- [21] Macuda J., Solecki T., Zanieczyszczenie wód podziemnych substancjami węglowodorowymi w rejonie rafinerii ropy naftowej, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 23/1 (2006) 313-318
- [22] Willumsen P., Arvin E., Kinetics of degradation of surfactant-solubilized fluoranthene by a *Sphingomonas paucimobilis*, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2571-2578
- [23] Gu M.B., Chang S.T., Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant, *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001) 667-674

- [24] Santos E.C., Jacques R.J.S., Bento F.M., Peralba M.C.R., Selbach P.A., Sá E.L.S., Camargo F.A.O., Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp., *Biores. Technol.* 99 (2008) 2644-2649
- [25] Jacques R.J.S., Santos E.C., Bento F.M., Peralba M.C.R., Selbach P.A., Sá E.L.S., Camargo F.A.O., Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site, *Int. Biodeter. Biodegr.* 56 (2005) 143-150
- [26] Puntus I.F., Sakharovsky V.G., Filonov A.E., Boronin A.M., Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene, *Process Biochem.* 40 (2005) 2643-2648
- [27] Das K., Mukherjee A.K., Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India, *Biores. Technol.* 98 (2007) 1339-1345
- [28] Yu H., Zhu L., Zhou W., Enhanced desorption and biodegradation of phenanthrene in soil–water systems with the presence of anionic-nonionic mixed surfactants, *J. Hazard. Mater.* 142 (2007) 354-361
- [29] Kołwzan B., Grabas K., Pawełczyk A., Steininger M., Bioremediation of military area contaminated by petroleum products, *GeoCongress 2008: Geotechnics of Waste Management and Remediation* 503-510
- [30] Sabaté J., Viñas M., Solanas A.M., Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils, *Int. Biodeter. Biodegr.* 54 (2004) 19-25
- [31] Cybulski Z., Dziurla E., Kaczorek E., Olszanowski A., The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillacea strains, *Spill Sci. Technol. Bull.* 8 (2003) 503-507
- [32] Pizzul L., del Pilar Castillo M., Stenström J., Characterization of selected actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil, *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 745-752
- [33] Płaza G. A., Łukasik K., Wypych J., Nałęcz-Jawecki G., Berry C., Brigmon R.L., Biodegradation of crude oil and distillation products by biosurfactant-producing bacteria, *Polish J. of Environ. Stud.* 17 (2008) 87-94
- [34] Nhi-Cong L.T., Mikolasch A., Klenk H.-P., Schauer F., Degradation of the multiple branched alkane 2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane (pristane) in *Rhodococcus ruber* and *Mycobacterium neoaurum*, *Inter. Biodeter. Biodegr.* 63 (2009) 201-207

- [35] Jahan K., Ahmed T., Maier W.J., Modeling the influence of nonionic surfactants on biodegradation of phenanthrene, *Wat. Res.* 33 (1999) 2181-2193
- [36] Płaza G.A., Jangid K., Łukasik K., Nałęcz-Jawecki G., Reduction of petroleum hydrocarbons and toxicity in refinery wastewater by bioremediation, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 81 (2008) 329-333
- [37] Anielak A., Biodegradacja wybranych barwników oraz ich wpływ na pracę osadu czynnego, Wydawnictwo Wyższej Szkoły Inżynierskiej w Koszalinie, Koszalin 1993
- [38] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P., Biodegradacja *ex situ* gruntu z klasycznych gazowni skażonego węglowodorami ropopochodnymi, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 24/1 (2007) 475-486
- [39] Steliga T., Kapusta P., Turkiewicz A., Jakubowicz P., Optymalizacja biodegradacji *in situ* odpadów wiertniczych zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi, *Wiertnictwo Nafta Gaz* 23/1 (2006) 409-419
- [40] Kitamoto D., Isoda H., Nakahara T., Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers, *J. Biosci. Bioeng.* 94 (2002) 187-201
- [41] Pyrenchenkova I. A., Gafarov A. B., Puntus I. F., Filonov A. E., Boronin A. M., Selection and characterization of active psychrotrophic microbial oil-degrading microorganisms, *Appl. Biochem. Microbiol.* 42 (2006) 263-269
- [42] Awe S., Mikolasch A., Hammer E., Schauer F., Degradation of phenylalkanes and characterization of aromatic intermediates acting as growth inhibiting substances in hydrocarbon utilizing yeast *Candida maltosa*, *Inter. Biodeter. Biodegr.* 62 (2008) 408-414
- [43] Heider J., Spormann A.M., Beller H.R., Widdel F., Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons, *FEMS Microbiology Reviews* 22 (1999) 459-473
- [44] Heider J., Adding handles to unhandy substrates: anaerobic hydrocarbon activation mechanisms, *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (2007) 188-194
- [45] Cheng Q., Thomas S.M., Rouvière P., Biological conversion of cyclic alkanes and cyclic alcohols into dicarboxylic acids: biochemical and molecular basis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002) 704-711



- [46] Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.-K., Zotchev S.B., Throne-Holst M., Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (2007) 1209-1221
- [47] Grossi V., Cravo-Laureau C., Méou A., Raphel D., Garzino F., Hirschler-Réa A., Anaerobic 1-alkene metabolism by the alkane- and alkene-degrading sulfate reducer *Desulfatibacillum aliphaticivorans* Strain CV2803<sup>TV</sup>, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 7882-7890
- [48] Grossi V., Cravo-Laureau C., Guyoneaud R., Ranchou-Peyruse A., Hirschler-Réa A., Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary, *Org. Geochem.* 39 (2008) 1197-1203
- [49] Piechowiak K., Zanieczyszczenie wód gruntowych związkami ropopochodnymi, *Wodociągi-Kanalizacja* 1/2007 (35)
- [50] Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philp J.C., Christofi N., Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14 (1998) 711-717
- [51] Mohan P.K., Nakhla G., Yanful E.K., Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions, *J. Environ. Eng.* 132 (2) (2006) 279-283
- [52] Vipulanandan C., Harendra S., Remediation of PCE contaminated soil using nanoparticles, *GeoCongress 2008: Geotechnics of Waste Management and Remediation* 455-462
- [53] Abbondanzi F., Bruzzi L., Campisi T., Frezzati A., Guerra R., Iacondini A., Biotreatability of polycyclic aromatic hydrocarbons in brackish sediments: Preliminary studies of an integrated monitoring, *International Biodeterioration Biodegradation* 57 (2006) 214-221
- [54] Franzetti A., Di Gennaro P., Bevilacqua A., Papacchini M., Bestetti G., Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation, *Chemosphere* 62 (2006) 1474-1480
- [55] Makkar R.S., Cameotra S.S., An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58 (2002) 428-434
- [56] Cassidy D.P., Hudak A.J., Dale Werkema D. Jr., Atekwana E.A., Rossbach S., Duris J.W., Atekwana E.A., Sauck W.A., *In situ* rhamnolipid production at an abandoned petroleum refinery, *Soil and Sediment Contamination* 11 (2002) 769-787

- [57] Kaya K., Morrison L.F., Codd G.A., Metcalf J.S., Sano T., Takagi H., Kubo T., A novel biosurfactant, 2-acyloxyethylphosphonate, isolated from waterblooms of *Aphanizomenon flos-aquae*, *Molecules* 11 (2006) 539-548
- [58] Zieliński R., „Surfaktanty, towaroznawcze i ekologiczne aspekty ich stosowania”, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań 2000
- [59] Lowe D.F., Oubre C.L., Ward C.H., Surfactants and cosolvents for NAPL remediation. A technology practices manual, CRC Press LLC 1999
- [60] Mulligan C.N., Yong R.N., Gibbs B.F., Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review, *Eng Geol* 60 (2001) 371-380
- [61] Bognolo G., Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids and Surfaces A* 152 (1999) 41-52
- [62] Bicca F.C., Fleck L.C., Ayub M.A.Z., Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*, *Rev. Microbiol.* 30 (1999)
- [63] Przondo J., „Związki powierzchniowo czynne i ich zastosowanie w produktach chemii gospodarczej”, Wyd. Politechniki Radomskiej, Radom 2004,
- [64] Ogonowski J., A. Tomaszewicz-Potępa, „Związki powierzchniowo czynne”, Wyd. Politechniki Krakowskiej, Kraków 1999,
- [65] Dutkiewicz E.T., „Fizykochemia Powierzchni”, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1998,
- [66] Lundsten G., Backlund S., The isotropic oil-surfactant-rich phase in systems of aromatic oils, nonionic surfactants and water, *J. Coll. Interf. Sci.* 169 (1995) 408-413
- [67] Butt H.-J., Graf K., Kappl M., Physics and chemistry of interfaces, 2003 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- [68] Monticone V., Mannebach M. H., Treiner C., Coadsorption of 2-naphthol and cetylpyridinium chloride at a siliciflater interface in relation with the micellar solubilization effect, *Lungmuir* 10 (1994) 2395-2398
- [69] Jeong H.-S., Lim D.-J., Hwang S.-H., Ha S.-D., Kong J.-U., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* immobilised in polyvinyl alcohol beads, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 35-39

- [70] Gumienna M., Czarnecka M., Czarnecki Z., Kondensat podezodoryzacyjny jako substrat tłuszczowy w biosyntezie związków powierzchniowo czynnych z wykorzystaniem drożdży *Candida bombicola*, *Technologia Alimentaria* 1 (2002) 71-82
- [71] Kim H.-S., Jeon J.-W., Kim B.-H., Ahn C.-Y., Oh H.-M., Yoon B.-D., Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida sp.* SY16 using fed-batch fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (2006) 391-396
- [72] Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P., Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology, *Biotech. Advances* 24 (2006) 604-620
- [73] Kim H.-S., Jeon J.-W., Kim S.-B., Oh H.-M., Kwon T.-J., Yoon B.-D., Surface and physico-chemical properties of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 1637-1641
- [74] Nitschke M., Costa S.G.V.A.O., Contiero J., Rhamnolipid surfactants: An update on the general aspects of these remarkable biomolecules, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 1593-1600
- [75] Mukherjee S., Das P., Sen R., Towards commercial production of microbial surfactants, *Trends Biotechnol.* 24 (2006) 509-515
- [76] Wang S.-Y., Vipulanandan C., Enhancing TCE solubility by biosurfactant produced from used vegetable oil, Poster presentation, CIGMAT 2000 Conference, Houston, Texas
- [77] Tabatabaee A., Assadi M.M., Noohi A.A., Sajadian V.A., Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs, *Iranian J. Env. Health Sci. Eng.* 2 (2005) 6-12
- [78] Rocha M.V.P., Oliveira A.H.S., Souza M.C.M., Gonçalves L.R.B., Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 1295-1299
- [79] Vipulanandan C., Harendra S., Hariharan S.G., Performance of biosurfactant produced from used vegetable oil, *GeoCongress 2008: Geotechnics of Waste Management and Remediation* 328-335
- [80] Sen R., Swaminathan T., Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47 (1997) 358-363

- [81] Cooper D.G., Macdonald C. R., Duff S. J.B., Kosaric N., Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions, *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981) 408-412
- [82] Desai J.D., Banat I.M., Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 47-64
- [83] Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi T.K., Sivachidambaram P., Biosurfactants: Properties, commercial production and application, *Curr. Science* 94 (2008) 736-747
- [84] Bissinger R.L., Carlson C.A., Surfactant, *Newborn and Infant Nursing Reviews* 6 (2006) 87-93
- [85] Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A., *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 301-305
- [86] Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S., Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 (2000) 459-508
- [87] Fu H., Zeng G., Zhong H., Yuan X., Wang W., Huang G., Li J., Effects of rhamnolipid on degradation of granular organic substrate from kitchen waste by a *Pseudomonas aeruginosa* strain, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 58 (2007) 91-97
- [88] Abalos A., Pinazo A., Infante M.R., Casals M., Garcí'a F., Manresa A., Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes, *Langmuir* 17 (2001) 1367-1371
- [89] Maneerat S., Biosurfactants from marine microorganisms, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27 (2005) 1263-1272
- [90] Piróllo M.P.S., Mariano A.P., Lovaglio R.B., Costa S.G.V.A.O., Walter V., Hausmann R., Contiero J., Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site, *J. Appl. Microbiol.* 105 (5) (2008) 1484-1490
- [91] Kassab D.M., Roane T.M., Differential responses of a mine tailings *Pseudomonas* isolate to cadmium and lead exposures, *Biodegradation* 17 (2006) 379-387
- [92] Juwarkar A.A., Nair A., Dubey K.V., Singh S.K., Devotta S., Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils, *Chemosphere* 68 (2007) 1996-2002

- [93] Mulligan C., Yongr, Gibbs B., James S., Bennett H.P.J., Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3812-3820
- [94] Santa Anna L.M., Sebastian G.V., Menezes E.P., Alves T.L.M., Santos A.S., Pereira Jr. N., Freire D.M.G., Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments, *Braz. J. Chem. Eng.* 19 (2002) 159-166
- [95] Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P., Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 99-121
- [96] Kosaric N., Biosurfactants and their application for soil bioremediation, *Food Technol. Biotechnol.* 39 (2001) 295-304
- [97] Lang S., Wullbrandt D., Rhamnolipids - biosynthesis, microbial production and application potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (1999) 22-32
- [98] Nitschke M., Costa S.G.V.A.O., Biosurfactants in food industry, *Trends in Food Science & Technology* 18 (2007) 252-259
- [99] Moraes I.O., Benincasa M., Monte Alegre R., Production and characterization of rhamnolipids produced by a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *Braz. J. Food Technol.* 5 (2002) 145-149
- [100] Dagbert C., Meylheuc T., Bellon-Fontaine M.-N., Corrosion behaviour of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*, *Electrochimica Acta* 51 (2006) 5221-5227
- [101] Edwards K.R., Lepo J.E., Lewis M.A., Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species, *Mar. Poll. Bull.* 46 (2003) 1309-1316
- [102] Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philp J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I., Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction, *J. Microbiol. Methods* 46 (2001) 149-156
- [103] Wei Y.-H. , Cheng C.-L., Chien C.-C., Wan H.-M., Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16, *Process Biochem* 43 (2008) 769-774
- [104] Mulligan C.N., Mahmoudides G., Gibbs B.F., Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Biotechnol.* 12 (1989) 37-44

- [105] Sim L., Ward O.P., Li Z.-Y., Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 19 (1997) 232-238
- [106] Chayabutra C., Wu J., Ju L.-K., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates, Biotechnol. Bioeng. 72 (2001) 25-33
- [107] Bednarski W., Adamczak M., Biotechnologiczne metody otrzymywania związków powierzchniowo aktywnych. Część II. Synteza związków powierzchniowo aktywnych przez mikroorganizmy, Biotechnologia 4 (1999) 24-44
- [108] Maier R.M., Soberón-Chávez G., *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54 (2000) 625-633
- [109] Soberón-Chávez G., Lépine F., Déziel E., Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 68 (2005) 718-725
- [110] Lang S., Biological amphiphiles (microbial biosurfactants), Curr. Opinion Colloid Interface Sci. 7 (2002) 12-20
- [111] Duynstee H.I., Vliet M.J., Marel G.A., Boom J.H., An efficient synthesis of (R)-3-[(R)-3-[2-O-(a-L-rhamnopyranosyl)-a-L-rhamnopyranosyl]oxydecanoyl]oxydecanoic acid, a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*, Eur. J. Org. Chem. (1998) 303-307
- [112] Benincasa M., Abalos A., Oliveira I., Manresa A., Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock, Antonie van Leeuwenhoek 85 (2004) 1-8
- [113] Wei Y.-H., Chou C.-L., Chang J.-S., Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater, Biochem. Eng. J. 27 (2005) 146-154
- [114] Heyd M., Kohnert A., Tan T.-H., Nusser M., Kirschhöfer F., Brenner-Weiss G., Franzreb M., Berensmeier S., Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example, Anal Bioanal Chem 391 (2008) 1579-1590
- [115] Schenk T., Schuphan I., Schmidt B., High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*, J. Chromatogr. A 693 (1995) 7-13

- [116] Bednarski W., Reps A. i in., *Biotechnologia żywności*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa
- [117] Metsämuuronen S., Nyström M., Evaluation of six flat sheet ultrafiltration membranes for fractionation of whey proteins, *Desalination* 200 (2006) 290-291
- [118] Narebska A., *Membrany i membranowe techniki rozdziału*, Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, 1997
- [119] Bacchin P., Aimar P., Sanchez V., Model for colloidal fouling of membranes, *AIChE J.* 41 (1995) 368-377
- [120] Bacchin, P.; Aimar, P.; Field, R.W., Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications, *Journal of Membrane Science* 281 (2006) 42-69
- [121] Field R.W., Wu D., Howell J.A., Gupta B.B., Critical flux concept for microfiltration fouling, *J. Membr. Sci.* 100 (1995) 259-272
- [122] Cubitto M.A., Morán A.C., Commendatore M., Chiarello M.N., Baldini M.D., Siñeriz F., Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils, *Biodegradation* 15 (2004) 281-287
- [123] Wang S., Mulligan C.N., An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil, *Chemosphere* 57 (2004) 1079-1089
- [124] Zhou W., Zhu L., Enhanced desorption of phenanthrene from contaminated soil using anionic/nonionic mixed surfactant, *Environ. Poll.* 147 (2007) 350-357
- [125] Zhou W., Zhu L., Efficiency of surfactant-enhanced desorption for contaminated soils depending on the component characteristics of soil-surfactant-PAHs system, *Environ. Poll.* 147 (2007) 66-73
- [126] Uysal A., Türkman A., Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor, *Process Biochem.* 40 (2005) 2745-2749
- [127] Giedraitytė G., Kalėdienė L., Bubinas A., Correlation between biosurfactant synthesis and microbial degradation of crude oil hydrocarbons, *Ekologija (Vilnius)* 3 (2001) 38-41
- [128] Mohamed A., Mahfoodh A.-S.M., Solubilization of naphthalene and pyrene by sodium dodecyl sulfate (SDS) and polyoxyethylenesorbitan monooleate

- (Tween 80) mixed micelles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 287 (2006) 44-50
- [129] Vasileva-Tonkova E., Gesheva V., Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp. during growth on hydrocarbons, *Curr. Microbiol.* 54 (2007) 136-141
- [130] Bordas F., Lafrance P., Villemur R., Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids, *Environ. Pollut.* 138 (2005) 69-76
- [131] Jin D., Jiang X., Jing X., Ou Z., Effects of concentration, head group, and structure of surfactants on the degradation of phenanthrene, *J. Hazard. Mater.* 144 (2007) 215-221
- [132] Schippers C., Geßner K., Müller T., Scheper T., Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture, *J. Biotechnol.* 83 (2000) 189-198
- [133] Jang S. A., Lee D.S., Lee M.W., Woo S.H., Toxicity of phenanthrene dissolved in nonionic surfactant solutions to *Pseudomonas putida* P2, *FEMS Microbiol. Lett.* 267 (2007) 194-199
- [134] Margesin R., Schinner F., Biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate at low temperatures, *Int. Biodeter. Biodegr.* 41 (2) (1998) 139-143
- [135] Volkering F., Breure A.M., Rulkens W.H., Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation, *Biodegradation* 8 (1998) 401-417
- [136] Huszcza E., Właściwości powierzchniowe lipopeptydów produkowanych przez bakterie *Bacillus Coagulans* / Praca doktorska. Promotor: prof. dr hab. inż. Bogdan Burczyk. Politechnika Wroclawska, 1996
- [137] Lang S., Philp J.C., Surface-active lipids in *Rhodococci*, *Antonie van Leeuwenhoek* 74 (1998) 59-70
- [138] Cameotra S.S., Singh P., Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species, *Microbial Cell Factories* 8 (2009)
- [139] Zhang Y., Miller R.M., Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane, *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (6) (1994) 2101-2106



- [140] Zhang Y., Miller R.M., Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of *n*-alkanes, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6) (1995) 2247-2251
- [141] Shin K.-H., Ahn Y., Kim K.-W., Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 2768-2774
- [142] Grabińska-Łoniewska A. i in., *Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999
- [143] Szewczyk E.M. i in., *Diagnostyka bakteriologiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005
- [144] Pawlaczyk-Szpilowa M., *Mikrobiologia wody i ścieków*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1980
- [145] Pawlaczyk-Szpilowa M., *Biologia i ekologia*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997
- [146] Cowan S.T., Steel K.J., *Manual for the identification of medical bacteria*, At The University Press, Cambridge 1965
- [147] Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M., McInerney M.J., Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms, *J. Microbiol. Methods* 56 (2004) 339-347
- [148] Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H., Trevors J.T., A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms, *J. Microbiol. Methods* 13 (1991) 271-279
- [149] Bodour A.A., Miller-Maier R.M., Application of modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms, *J. Microbiol. Methods* 32 (1998) 273-280
- [150] Tugrul T., Cansunar E., Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test, *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 21 (2005) 851-853
- [151] Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T., A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants, *Biochim. Biophys. Acta* 1488 (2000) 211-218
- [152] McInerney M.J., Javaheri M., Nagle Jr. D.N., Properties of the biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* JF-2, *J. Ind. Microbiol.* 5 (1990) 95-102

- [153] Isa M.H.M., Coraglia D. E., Frazier R.A., Jauregi P., Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process, *J. Membr. Sci.* 296 (2007) 51-57
- [154] Chandrasekaran E.V., Bemiller J.N., Constituent analysis of glycosaminoglycans, *Methods Carbohydr. Chem.* 8 (1980) 89-96
- [155] Czarny A., Kołwzan B., Zaczyńska E., Cytotoxicity and antibacterial activity of synthesis surfactants. *Chemicals in Sustainable Agriculture*. Ed. Czech-Pol Trade, Prague-Brussels-Stockholm. 2003, 563-567
- [156] Czarny A., Boratyński J., Kołwzan B., Isolation and characterisation of extracellular polymers produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry for agriculture* 5 (2004) 410-415, "New Agrochemicals and Their Safe Use for Health and Environment". Edited by H. Górecki, Z. Dobrzański, P. Kafarski, Czech-Pol Trade, Prague-Brussels.
- [157] Mendyka B., Radek P., Wargacka A., Czarny A., Zaczyńska E., Pawlik M., Cytotoksyczność i mutagenność preparatów zawierających domieszkę estru metyloвого oleju rzepakowego, *Medycyna Środowiskowa* 8 (2008) 139-145
- [158] Kołwzan B., Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną, *Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej*, Wrocław 2005
- [159] Makkar R.S., Cameotra S.S., Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources, *J. Surfactants Deterg.* 2 (1999) 237-241
- [160] Déziel É., Paquette G., Villemur R., Lépine F., Bisailon J.-G., Biosurfactant Production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 1908-1912
- [161] Itoh S., Honda H., Tomita F., Suzuki T., Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> and C<sub>14</sub> fractions), *J. Antibiot.* 24 (1971) 855-859
- [162] Perfumo A., Banat I.M., Canganella F., Marchant R., Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1, *Appl. Microbiol Biotechnol* 72 (2006) 132-138
- [163] Costa S.G.V.A.O., Nitschke M., Haddad R., Eberlin M.N., Contiero J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils, *Proc. Biochem.* 41 (2006) 483-488

- [164] Nitschke M., Costa S.G.V.A.O., Haddad R., Gonçalves L.A.G., Eberlin M.N., Contiero J., Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005) 1562-1566
- [165] Raza Z.A., Rehman A., Khan M.S., Khalid Z.M., Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes, *Biodegradation* 18 (2007) 115-121
- [166] Benincasa M., Contiero J., Manresa M.A., Moraes I.O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source, *J. Food Eng.* 54 (2002) 283-288
- [167] Chen S.-Y., Lu W.-B., Wei Y.-H., Chen W.-M., Chang J.-S., Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2, *Biotechnol. Prog.* 23 (2007) 661-666
- [168] Rashedi H., Jamshidi E., Mazaheri Assadi M., Bonakdarpour B., Biosurfactant production with glucose as a carbon source, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 20 (2006) 99-106
- [169] Hudak A.J., Cassidy D.P., Stimulating in-soil rhamnolipid production in a bioslurry reactor by limiting nitrogen, *Biotechnol. Bioeng.* 88 (2004) 861-868
- [170] Bhattacharjee C., Datta S., Analysis of polarized layer resistance during ultrafiltration of PEG-6000: an approach based on filtration theory, *Sep. Purif. Technol.* 33 (2003) 115-126
- [171] Chen H.-L., Chen Y.-S., Juang R.-S., Flux decline and membrane cleaning in cross-flow ultrafiltration of treated fermentation broths for surfactin recovery, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008) 47-55
- [172] Juang R.-S., Chen H.-L., Chen Y.-S., Resistance-in-series analysis in cross-flow ultrafiltration of fermentation broths of *Bacillus subtilis* culture, *J. Membr. Sci.* 323 (2008) 193-200
- [173] Sen R., Swaminathan T., Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin, *Process Biochemistry* 40 (2005) 2953-2958
- [174] Zhao Y.J., Wu K.F., Wang Z.J., Zhao L., Li S.S., Fouling and cleaning of membrane - a literature review, *Environ. Sci.* 12 (2000) 241-251

- [175] Chen H.L., Chen Y.S., Juang R.S., Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes, *J. Membr. Sci.* 299 (2007) 114-121
- [176] Zhang Y., Miller R.M., Enhanced octadecane dispersion by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant), *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (10) (1992) 3276-3282
- [177] Mathew D.S., Juang R.S., Role of alcohols in the formation of inverse microemulsions and back extraction of proteins/enzymes in a reverse micellar system, *Sep. Purif. Technol.* 53 (2007) 199-215
- [178] Isa M.H.M., Frazier R.A., Jauregi P., A further study of the recovery and purification of surfactin from fermentation broth by membrane filtration, *Sep. Purif. Technol.* 64 (2008) 176-182
- [179] Kołwzan B., Biazik J., Czarny A., Zaczyńska E., Karpenko E., „Ocena toksyczności biosurfaktantów produkowanych przez *Pseudomonas sp.* PS-17”, *Ekotoksykologia w ochronie środowiska : praca zbiorowa / pod red. Barbary Kołwzan i Kazimierza Grabasa*. Wrocław : Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych. Oddział Dolnośląski, 2008. s. 191-196.
- [180] Kaczorek E., Chrzanowski Ł., Pijanowska A., Olszanowski A., Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: rhamnolipids and saponins. *Bioresource Technology* 99 (2008) 4285-4291
- [181] Jain D.K., Lee H., Trevors J.T., Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil, *J. Ind. Microbiol.* 10 (1992) 87-93
- [182] Morán A.C., Olivera N., Commendatore M., Esteves J.L., Siñeriz F., Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9, *Biodegradation* 11 (2000) 65-71
- [183] Zhang Y., Maier W.J., Miller R.M., Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenantrene, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 2211-2217
- [184] Malina G., Biowentylacja (SBV) strefy aeracji zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi. *Politechnika Częstochowska Seria MONOGRAFIE nr 66* (1999) Częstochowa
- [185] Sánchez M., Aranda F.J., Espuny M.J., Marqués A., Teruel J.A., Manresa Á., Ortiz A., Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant

- secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media, J. Coll. Interf. Sci. 307 (2007) 246-253
- [186] Shin K.-H., Kim K.-W., Ahn Y., Use of biosurfactant to remediate phenanthrene - contaminated soil by the combined solubilization - biodegradation process, J. Hazard. Mater. B137 (2006) 1831-1837
- [187] Das K., Mukherjee A.K., Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non- mucoid strains isolated from hydrocarbon - contaminated soil samples, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69 (2005) 192- 199.
- [188] Reiling H.E., Thanei-Wyss U., Guerra-Santos L.H., Hirt R., Käppeli O., Fiechter A., Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*, Appl. Environ. Microbiol. 51 (1986) 985-989
- [189] Lin S-C; Jiang H-J, Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration, Biotechnology Techniques 11 (1997) 413 - 416
- [190] Yin H, Qiang J, Jia Y, Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater, Proc. Biochem. 44 (2009) 302-308
- [191] Clifford J.S., Ioannidis M.A., Legge R.L., Enhanced aqueous solubilization of tetrachloroethylene by a rhamnolipid biosurfactant, J. Coll. Int. Sci. 305 (2007) 361-365
- [192] Dubey K., Juwarkar A., Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production, W. J. Microbiol. Biotechnol. 17 (2001) 61- 69
- [193] Śliwka E., Kołwzan B., Grabas K., Karpenko E., Rutkowski P., Influence of rhamnolipid from *Pseudomonas* PS-17 on coal tar and petroleum residue biodegradation, Environ. Protect. Eng. 35 (2009) 139-150
- [194] Mulligan C.N., Environmental applications for biosurfactants, Environ. Pollut. 133 (2005) 183-198
- [195] Johnsen A.R., Henriksen S., Microplate MPN- enumeration of monocyclic- and dicyclic- aromatic hydrocarbon degraders via substrate phase-partitioning, Biodegradation 20 (2009) 581-589
- [196] Sánchez M., Aranda F.J., Espuny M.J., Marqués A., Teruel J.A., Manresa Á., Ortiz A., Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant

secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media, J. Coll. Interf. Sci. 307 (2007) 246-253

- [197] Shin K.-H., Kim K.-W., Ahn Y., Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process, J. Hazard. Mater. B137 (2006) 1831-1837
- [198] Benincasa M., Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil, Curr. Microbiol. 54 (2007) 445-449