

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Cytometria przepływowa jako nowoczesne narzędzie stosowane w ocenie aktywności mikroorganizmów biodegradowujących wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) w procesie bioremediacji środowiska

ZUZANNA SZCZEPANIAK¹, JUSTYNA STANINSKA², AGNIESZKA PIOTROWSKA-CYPLIK¹,
WOJCIECH JUZWA²

UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego¹
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności²

Słowa kluczowe: ramnolipidy, WWA, cytometria przepływowa, aktywność metaboliczna

STRESZCZENIE

Zanieczyszczenie środowiska związkami organicznymi można zredukować m.in. poprzez metody bioremediacyjne z wykorzystaniem np. bioaugmentacji lub biosurfaktantów. Celem badań jest określenie aktywności metabolicznej konsorcjów mikrobiologicznych dodawanych na zasadzie bioaugmentacji oraz mikroorganizmów autochtonicznych w obecności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) i biosurfaktantów (ramnolipidów) w środowisku glebowym. Aktywność metaboliczna została wyznaczona dzięki zastosowaniu cytometrii przepływowej. Uzyskane wyniki wskazują zarówno na konkurencję pomiędzy mikroorganizmami wprowadzonymi dodatkowo a mikroorganizmami autochtonicznymi już po trzech miesiącach trwania eksperymentu, jak również na zdominowanie układu przez dodatkowo wprowadzone mikroorganizmy po upływie sześciu miesięcy. Równocześnie wyniki nie wskazują na jakikolwiek wpływ dodanych ramnolipidów na wartość %Q2.

Flow cytometry as a modern tool in evaluation the activity of microorganisms degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bioremediation process

Keywords: rhamnolipids, PAH, flow cytometry, metabolic activity

ABSTRACT

Environmental pollution by organic compounds can be reduced by the use of bioremediation methods e.g. bioaugmentation enhanced by the addition of biosurfactants. The aim of this study was to determine the metabolic activity of both microbial consortia added into system and autochthonous microorganisms in the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and biosurfactants (rhamnolipids) in the soil system. Metabolic activity was determined using flow cytometry. The results indicate both the competition between additional and autochthonous microorganisms after three months, as well as the dominance of additional microorganisms over native microorganisms after six months of start of the experiment. Moreover, the results do not indicate any effect of rhamnolipids on the value of %Q2.

1. WSTĘP

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to grupa związków składających się co najmniej z dwóch homocyklicznych pierścieni aromatycznych o udowodnionych właściwościach kancerogennych, mutagennych i teratogennych. Szczególne niebezpieczeństwo toksykologiczne WWA związane jest z wieloma mechanizmami działania toksycznego oraz gwałtowną biotransformacją WWA z wykorzystaniem enzymów CYP1, co prowadzi do wytworzenia szeregu metabolitów pośrednich o szerokim spektrum działania [1]. Źródła wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych w środowisku można zakwalifikować zarówno jako naturalne (w mniejszym stopniu), w tym pożary lasów i pastwisk, erupcje wulkanów, jak i antropogeniczne, np. spalanie i przeróbka paliw, głównie ropy naftowej i węgla, przemysł koksowniczy, hutniczy, działanie elektrociepłowni [2]. Obecnie istnieją metody fizyko-chemiczne, jak i biologiczne usuwania związków hydrofobowych ze środowiska [3]. Podstawową wadą metod fizyko-chemicznych usuwania zanieczyszczeń jest brak całkowitej eliminacji ksenobiotyków ze środowiska. Metody te pozwalają jedynie na przeniesienie zanieczyszczenia do miejsca składowania lub oczyszczania. Metody biologiczne, w tym bioremediacja oparta na procesie biodegradacji, umożliwiają konwersję skomplikowanych strukturalnie związków chemicznych do związków prostych, niezagrażających środowisku (w końcowym etapie produktami są dwutlenek

węgla i woda). Istnieją jednak czynniki w znaczny sposób limitujące proces biodegradacji, w tym niska biodostępność związków hydrofobowych dla mikroorganizmów je degradujących [4]. W związku z tym istnieje szereg metod wspomagających procesy biodegradacyjne, takie jak bioaugmentacja opierająca się na dodatku mikroorganizmów o wysokim potencjale metabolicznym w stosunku do danego zanieczyszczenia. Duże nadzieje upatruje się zwłaszcza w konsorcjach mikrobiologicznych izolowanych z miejsc trwale zanieczyszczonych, mających teoretycznie wysoki potencjał biodegradacyjny. Oprócz dodatku konsorcjów mikrobiologicznych, stosuje się również dodatek surfaktantów, w tym biosurfaktantów, czyli związków powierzchniowo czynnych pochodzenia mikrobiologicznego. Przykładem biosurfaktantów wykorzystywanych w procesach bioremediacyjnych są rhamnolipidy [5].

Mikroorganizmy wprowadzane do środowiska na zasadzie bioaugmentacji mają na celu maksymalizację procesów biodegradacyjnych. Takie konsorcja mikrobiologiczne powinny cechować się możliwie wysoką aktywnością metaboliczną oraz zdolnościami adaptacji i funkcjonowania w otoczeniu mikroflory autochtonicznej. Określenie aktywności metabolicznej oraz możliwości adaptacji i funkcjonowania konsorcjów mikrobiologicznych dodawanych na zasadzie bioaugmentacji w otoczeniu mikroorganizmów autochtonicznych jest możliwe dzięki zastosowaniu metod cytometrii przepływowej z barwieniem fluorescencyjnym. Pozwala to na analizę stanu metabolicznego po-

jedynczych komórek, a co za tym idzie poznanie udziału poszczególnych gatunków w konsorcjach mikrobiologicznych podczas biodegradacji. Dzięki cytometrii przepływowej możliwa jest obserwacja zarówno aktywności metabolicznej, jak i zmienności populacyjnych poszczególnych gatunków mikroorganizmów. Istota metody polega na zabarwieniu komórek, które w pierwszym etapie analizy ustawiane są w rzędzie cienkiego strumienia i dalej przesuwane w strefę pomiaru, gdzie następuje naświetlanie pojedynczych komórek wiązką lasera. Rozproszone światło wzbudza fluorochromy, a powstające sygnały analizowane są za pomocą detektorów. Ostatnim etapem analizy jest obróbka komputerowa uzyskanych danych [6]. Jak podaje Oleszczuk, dzięki stosowaniu różnego rodzaju metod fizyko-chemicznych, w tym filtrów, elektrofiltrów itp., problem usuwania zanieczyszczeń atmosfery i wody jest dużo mniejszy niż w przypadku zanieczyszczeń tak skomplikowanej matrycy, jaką jest gleba [7]. W związku z tym istnieje potrzeba zwrócenia uwagi na środowisko glebowe w kontekście utrudnionego i mocno ograniczonego pod względem technicznym doboru metod i technologii umożliwiających efektywną rekultywację gruntów.

Celem badań było określenie aktywności metabolicznej konsorcjów mikrobiologicznych dodawanych na zasadzie bioaugmentacji oraz mikroorganizmów autochtonicznych w obecności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) i biosurfaktantów (ramnolipidów). Badania prowadzone były w środowisku glebowym.

2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

2.1 Materiały i metody

2.1.1 Odczynniki chemiczne

W doświadczeniu wykorzystano wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne firmy Sigma Aldrich w następujących proporcjach na każdy układ (w sumie 200 mg WWA na jeden układ glebowy): naftalen 34,84 mg; fenantren 34,84 mg; fluoren 34,84 mg; antracen 34,84 mg; piren 30 mg; fluoranten 9,88 mg; acenaftylen 9,88 mg; acenaften 9,88 mg; chryzen 0,2 mg; benzo[a]antracen 0,2 mg; benzo[k]fluoranten 0,2 mg; benzo[b]fluoranten 0,2 mg; benzo[a]piren 0,2 mg.

Ramnolipidy wykorzystywane podczas badań dostarczone zostały za pośrednictwem firmy AGAE i charakteryzowały się 90% czystością i 5% stężeniem.

2.1.2 Gleba i mikroorganizmy

Gleba wykorzystywana w doświadczeniu pochodzi z miejsca zurbanizowanego – centrum Poznania. Przed rozpoczęciem eksperymentów została przesiana przez sito laboratoryjne w obudowie metalowej o rozmiarze oczka 4 mm. Pozwoliło to na eliminację większych cząstek stałych, które mogłyby wprowadzić istotne zaburzenia w określeniu masy układu. Inokulum mikroorganizmów przygotowano zgodnie z następującym schematem: pobrano 10 g gleby z okolic Solca Kujawskiego – miejsca około stuletniej działalności Nasycalni Podkładów Kolejowych. Przedsiębiorstwo to zajmowało się impregnacją drewna dla potrzeb kolejnictwa, wykorzystując do tego celu olej krezotowy. Pobraną glebę wytrząsano z 90 ml soli fizjologicznej przez 15 minut, po czym mikroorganizmy znajdujące się w ekstrakcie (5 ml) namnażano w układzie wodnym zawierającym standardowe medium mineralne M9 oraz mieszaninę naftalenu, fenantrenu i pirenu w maksymalnych stężeniach nieprzekraczających granicy rozpuszczalności. Dodatek mieszaniny WWA był niezbędny na tym etapie ze względu na konieczność selekcji mikroorganizmów zdolnych do propagacji w obecności WWA i metabolizowania ich jako jedyne źródła węgla. Po etapie wstępnego namnażania i odwirowania, osad został zawieszony w 5 ml soli fizjologicznej. Preinokulat został poddany namnażaniu właściwemu w obecności oleju napędowego (5 ml) i standardowego medium mineralnego M9 (50 ml), przy czym prowadzona była spektrofotometryczna (spektrofotometr UV-Vis, Thermo Scientific, 600 nm) względna ocena kinetyki wzrostu konsorcjum online. Na podstawie obserwacji krzywej wzrostu konsorcjum po wejściu w fazę logarytmiczną osad odwirowano i zawieszono w soli fizjologicznej w celu uzyskania ostatecznego stężenia 10^6 jtk/ml. Inokulum wprowadzono w sposób bezpośredni (w postaci płynnej) do 50 g gleby (na tym etapie wprowadzono też WWA i ramnolipidy w zależności od wariantu), po czym dodano pozostałe 150 g gleby i wymieszano w celu homogenizacji.

2.1.3 Zastosowane warianty doświadczenia

Eksperymenty prowadzono w następujących układach doświadczalnych: 1) 200 g gleby (układ odniesienia); 2) 200 g gleby + wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne; 3) 200 g gleby + wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne + dodatkowe mikroorganizmy; 4) 200 g gleby + wielo-

pierścieniowe węglowodory aromatyczne + ramnolipidy; 5) 200 g gleby + wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne + dodatkowe mikroorganizmy + ramnolipidy.

Analizy zostały wykonane po: 1) jednym miesiącu; 2) trzech miesiącach; 3) sześciu miesiącach; 4) dwunastu miesiącach trwania doświadczenia. W celu utrzymania jednakowych warunków układu przetrzymywano w stałej temperaturze (18-20°C) oraz uzupełniano wilgotność gleby (do wartości początkowej 31%) co cztery – osiem tygodni.

2.1.4 Badania nad aktywnością metaboliczną mikroorganizmów

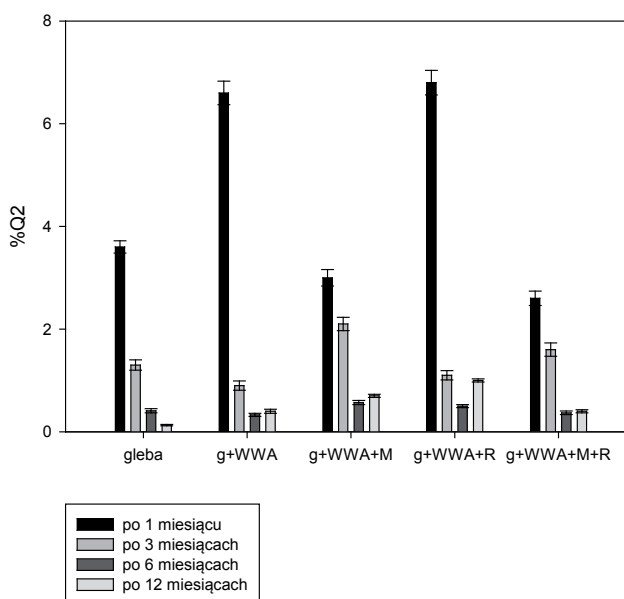
Do badań nad aktywnością metaboliczną mikroorganizmów wykorzystano cytometr przepływowy BD FACS Aria™ III firmy Becton Dickinson Biosciences. Materiał do analizy został przygotowany w oparciu o metodykę zaproponowaną przez Molecular Probes Invitrogen Detection Technologies (BaLight™ RedoxSensor™ Green Vitality Kit). Niezbędne wcześniejsze przygotowanie materiału składało się z następujących etapów: układy glebowe ekstrahowano wodą destylowaną w proporcji 10 g gleby:100 ml wody. Następnie wytrząsano całość przez ok. 15 minut i 2 ml zawiesiny filtrowano przez filtr o średnicy porów 20 µm. W kolejnym etapie układy wirowano (4 000 obr./min; 6 min), zlewano supernatant i przemywano osad 0,5 ml roztworu PBS. Jako barwniki dodano odczynnik green (1,5 µl) i jodek propidyny (0,8 µl), po czym całość inkubowano w temperaturze 38°C przez 10 min. Odczynnik green jest barwnikiem fluorescencyjnym służącym do pomiaru redox, natomiast jodek propidyny służy do pomiaru żywotności komórek na zasadzie intensywnego wnikania do komórek z uszkodzoną ścianą komórkową i braku wnikania (a co za tym idzie braku barwienia) do komórek nieuszkodzonych. Ostatnim etapem była analiza cytometryczna.

2.2 Analiza statystyczna

Badania wykonano w trzech powtórzeniach, z których wyliczono odchylenie standardowe od wyniku średniego.

3. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

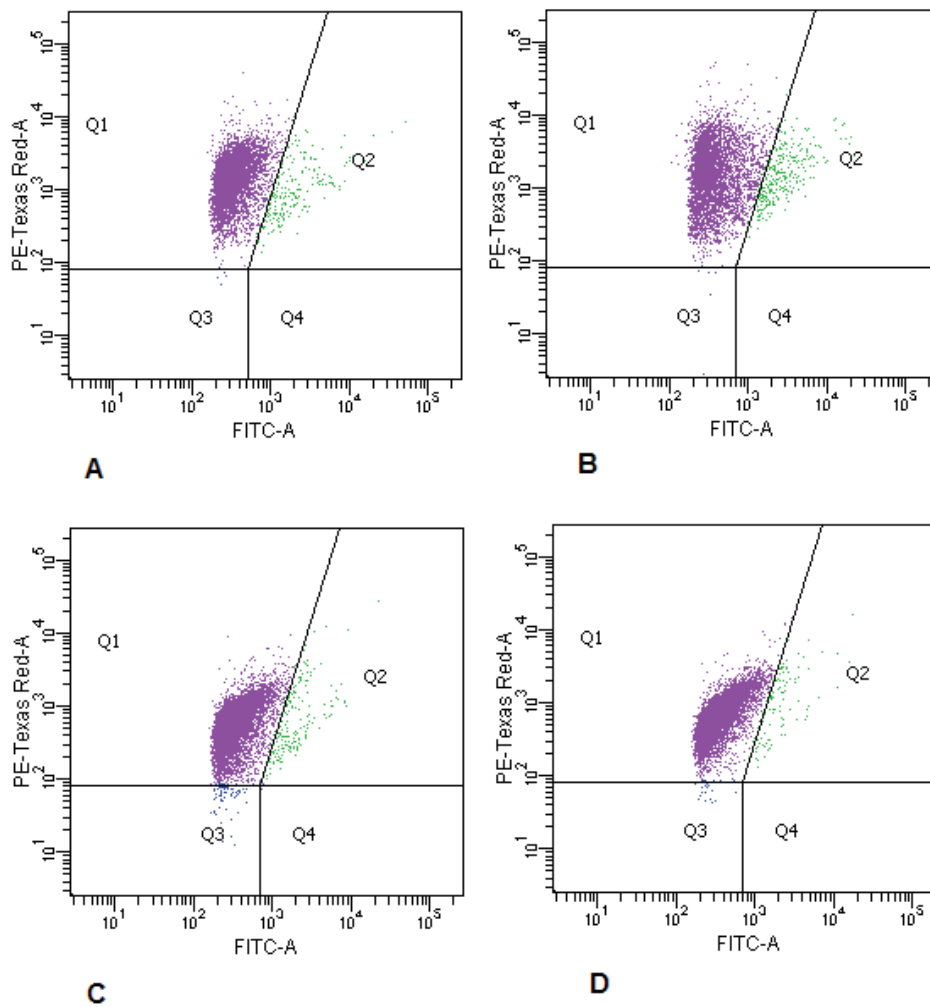
Analizując różnice aktywności metabolicznej poszczególnych wariantów (Rys. 1) należy zwrócić



Rysunek 1 Procent populacji aktywnej (%Q2) w poszczególnych wariantach

szczególną uwagę na parametr określający procent komórek o najwyższym potencjale oksydo-redukcyjnym (%Q2). Procent populacji Q2 został wyznaczony poprzez podział pola na wykresach typu dot plot na cztery części, dzięki czemu możliwe było jednoznaczne zaznaczenie granicy pomiędzy populacją Q2 a pozostałymi populacjami. Wykresy typu dot plot wybranych wariantów przedstawiające wyznaczony podział przedstawione zostały na Rysunku 2.

Po pierwszym miesiącu trwania eksperymentu najwięcej komórek wysoce aktywnych metabolicznie (o najwyższym %Q2) znajdowało się w wariacie gleba + WWA + ramnolipidy (6,8%), nieznacznie mniej w wariacie gleba + WWA (6,6%). Może być to spowodowane obecnością dodatkowego źródła węgla dla mikroorganizmów w postaci WWA i ramnolipidów, co wpływa na ich aktywność metaboliczną. Warto zauważyć, że w układach zawierających dodatkowe konsorcjum mikrobiologiczne, czyli w wariantach gleba + WWA + mikroorganizmy oraz gleba + WWA + mikroorganizmy + ramnolipidy, procent populacji aktywnej jest najniższy (kolejno 3% i 2,6%). Jest to sprzeczne z doniesieniami literaturowymi wskazującymi na wysoką zdolność metabolizowania związków węglowodorowych przez konsorcja z terenów trwale zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi [5]. Z drugiej jednak strony, należy przypuszczać, że doszło w tym wypadku do oddziaływań antagonistycznych – konkurencji o zasoby pokarmowe (źródło



Rysunek 2 Wykresy kropkowe pokazujące zależność pola powierzchni sygnału fluorescencji z odczynnika RedoxSensor (FITC-A) oraz jodku propidyny, umożliwiającego rozróżnianie martwych/żywych komórek wariantów: A) gleba+WWA+mikroorganizmy po pierwszym miesiącu; B) gleba+WWA+ramnolipidy po pierwszym miesiącu; C) gleba+WWA+mikroorganizmy po trzecim miesiącu; D) gleba+WWA+ramnolipidy po trzecim miesiącu

węgla) pomiędzy mikroorganizmami autochtonicznymi (rodzimymi) a konsorcjum mikrobiologicznym dodawanym na zasadzie bioaugmentacji, czego efektem jest spadek ilości komórek o najwyższym potencjale oksydo-redukcyjnym [8]. Ponadto brak istotnej różnicy pomiędzy wariantami zawierającymi WWA oraz WWA + ramnolipidy, a także WWA + mikroorganizmy oraz WWA + mikroorganizmy + ramnolipidy sugeruje brak dodatkowego wpływu biosurfaktantów na biodostępność substratów. Jest to sprzeczne między innymi z badaniami Sliwki et al. (2009), w których udowodniono korzystny wpływ ramnolipidów izolowanych z *Pseudomonas* PS-17 na biodegradację składników smoły węglowej poprzez zwiększenie ich biodostępności [9].

Inną tendencją charakteryzują się wyniki otrzymane po trzech miesiącach trwania eksperymentu. W tym przypadku, odwrotnie niż po pierwszym miesiącu, największą ilość komórek wyso-

ce aktywnych metabolicznie wykazują warianty z dodatkowymi mikroorganizmami, czyli gleba + WWA + mikroorganizmy (2,1%) oraz gleba + WWA + mikroorganizmy + ramnolipidy (1,9%). Może być to związane z faktem całkowitej adaptacji i dominacji mikroorganizmów dodawanych z zewnątrz nad mikroorganizmami autochtonicznymi. Zatem dopiero po trzech miesiącach możliwe było potwierdzenie tezy o wysokiej aktywności metabolicznej konsorcjów izolowanych z miejsc trwale zanieczyszczonych. Jacques et al. (2008) testując w ciągu 70 dni konsorcjum mikrobiologiczne (bakterie: *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae* bacterium, *Naphthalene-utilizing bacterium* i grzyb *Fusarium oxysporum*) izolowane z terenów zanieczyszczonych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi potwierdzili jego dużo większe zdolności biodegradacyjne (szczególnie w odniesieniu

do antracenu fenantrenu i pirenu, gdzie odnotowano kolejno 99%, 99% i 96%) w porównaniu do mikroorganizmów autochtonicznych [10].

Warianty, które po pierwszym miesiącu charakteryzowały się najwyższą wartością %Q2, czyli gleba + WWA oraz gleba + WWA + ramnolipidy, po trzech miesiącach cechują się niższą – w porównaniu do wariantów z dodatkowymi mikroorganizmami – aktywnością metaboliczną. Niższa wartość %Q2 może być związana z wyczerpaniem się dodatkowego źródła węgla, jakim były WWA oraz ramnolipidy.

Po sześciu oraz po dwunastu miesiącach wartości %Q2 były zbliżone. Szczególnie po sześciu miesiącach nie ma znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami.

Analizując różnice w wartościach %Q2 w funkcji czasu można zauważyć, że w czasie pierwszych sześciu miesięcy ilość komórek wysoce aktywnych metabolicznie w poszczególnych wariantach znacznie maleje. Jest to najpewniej wynik stopniowego wyczerpywania się zarówno źródła węgla, jak i pozostałych składników odżywczych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania mikroorganizmów. W ciągu kolejnych sześciu mie-

sięcy (dwunasty miesiąc trwania eksperymentu) nie nastąpiły znaczące różnice w wartościach %Q2.

4. PODSUMOWANIE

Otrzymane rezultaty wskazują na złożone oddziaływanie między autochtoniczną mikroflorą glebową a dodatkowo wprowadzonym konsorcjum mikrobiologicznym i istotny wpływ dodatkowych mikroorganizmów na mierzoną aktywność metaboliczną. Widoczne spadki w %Q2 mogą być tłumaczone konkurencją pomiędzy mikroorganizmami. Efekt toksyczny WWA jest mało prawdopodobny ze względu na podwyższoną aktywność metaboliczną układu gleba + WWA w porównaniu do układu kontrolnego (gleba) po upływie 1 miesiąca trwania eksperymentu. Równocześnie wyniki nie wskazują na jakikolwiek wpływ dodanych ramnolipidów na wartość %Q2.

5. FINANSOWANIE

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr. 2011/03/B/NZ9/00274 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

LITERATURA

- [1] Billiard S. M., Meyer J. N., Wassenberg D. M., Hodson P. V., Giulio R. T., Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: Mechanisms and Implications for Risk Assessment, *Toxicol Sci*, 105, 2008, 5-23.
- [2] Pazos M., Rosales E., Alcantara T., Gomez J., Sanroman M. A., Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: A review, *J Hazard Mater*, 177, 2010, 1-11.
- [3] Khan F. I., Husain T., Hejazi R., An overview and analysis of site remediation technologies, *J Environ Manage*, 71, 2004, 95-122.
- [4] Johnsen A. R., Wick L. Y., Harms H., Principles of microbial PAH-degradation in soil, *Environ Pollut*, 133, 2005, 71-84.
- [5] Owsianiak M., Szulc A., Chrzanowski Ł., Cyplik P., Bogacki M., Olejnik-Schmidt A. K., Heipieper H. J., Biodegradation and surfactant-mediated biodegradation of diesel fuel by 218 microbial consortia are not correlated to cell surface hydrophobicity, *Appl Microbiol Biotechnol*, 84, 2009, 545-553.
- [6] Baran J., Nowa epoka cytometrii przepływowej – przewodnik po współczesnych cytometrach i ich zastosowanie, *Post Biol Komórki*, 35, 2008, 3-15.
- [7] Oleszczuk P., Zastosowanie surfaktantów i biosurfaktantów w usuwaniu trwałych zanieczyszczeń organicznych i ropopochodnych z gleby, *Roczniki Gleboznawcze*, 53, 2002, 61-75.
- [8] Kassen R., Llewellyn M., Rainey P. B., Ecological constraints on diversification in a model adaptive radiation, *Nature* 431, 2004, 984-988.
- [9] Sliwka E., Kołwzan B., Grabas K., Karpenko E., Rutkowski P., Influence of rhamnolipids from *Pseudomonas PS-17* on coal tar and petroleum residue biodegradation, *Environ Prot Eng*, 35, 2009, 139-150.
- [10] Jacques R. J. S., Okeke B. C., Bento F. M., Teixeira A. S., Peralba M. C. R., Camargo F. A. O., Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil, *Biore-sour Technol* 99, 2008, 2637-2643.