

# Wykorzystanie metod spektroskopowych w oznaczaniu aktywności mikroorganizmów

E. Kaczorek, A. Olszanowski\*

## Wprowadzenie

Węglowodory ropy naftowej są szeroko rozpowszechnionymi zanieczyszczeniami środowiska. Przedostają się one coraz częściej do ekosystemów wodnych i lądowych podczas wydobywania, transportu, obróbki przemysłowej bądź użytkowania. Hamują one wymianę gazową, ograniczają dostęp światła, zmniejszają stężenie rozpuszczonego tlenu, degradują wody gruntowe i powierzchniowe, zanieczyszczają glebę i grunty, zaburzają homeostazę, a przede wszystkim mają działanie toksyczne, mutagenne i kancerogenne na wszystkie organizmy. W celu ograniczenia ujemnych skutków skażenia tymi substancjami stosuje się szereg metod remediacji. Podczas wyboru sposobu procesu remediacji największą uwagę należy zwrócić na: strukturę oraz właściwości fizyczno-chemiczne gruntu, budowę profilu gruntowego, lokalizację wód podziemnych, wielkość i kierunek przepływu wód, położenie miejsca skażenia w stosunku do ujęć wody, charakterystykę związków zanieczyszczających pod kątem fizykochemicznym (właściwości takie jak: stężenie, rozpuszczalność w wodzie, reaktywność z innymi składnikami środowiska, podatność na roz-

kład biochemiczny), warunki klimatyczne, objętość i kształt plam zanieczyszczenia, względy techniczne i ekonomiczne. Opracowano wiele metod fizyko-chemicznych i biologicznych usuwania zanieczyszczeń naftowych ze środowiska gruntowo-wodnego. Obecnie coraz większe znaczenie zyskują technologie bioremediacyjne, które wykorzystują zdolności mikroorganizmów do degradacji zanieczyszczeń organicznych w celu przekształcenia ich w mniej toksyczne lub całkowicie nieszkodliwe składniki [1]. Bioremediacja jest najczęściej metodą kończącą proces rekultywacji środowiska naturalnego. Nie jest to jednak technologia uniwersalna, którą można wykonać w dowolnym obszarze i dowolnych okolicznościach. Bioremediacja obejmuje dwa zasadnicze kierunki[2-5]:

- stymulację rozwoju mikroorganizmów autochtonicznych, występujących w skażonym obszarze (biostymulacja), poprzez doprowadzenie pożywek dla bakterii, np. azotu w formie amonowej lub azotanowej i fosforu w formie fosforanowej, najczęściej w postaci odpowiedniego nawozu ciekłego lub stałego, dostarczeniu tlenu do układu (biowentylacja), w którym występuje jego niedobór (poprzez

napowietrzanie terenu, wprowadzenie związków bogatych w tlen oraz spulchnianie powierzchniowych warstw gleby), bądź regulowanie pH gleby i jej wilgotności,

- wprowadzenie do miejsca skażenia specjalnie wyselekcjonowanych mikroorganizmów, aktywnych w rozkładzie zanieczyszczeń ropopochodnych (bioaugmentacja), w postaci inokulum. Mogą to być mikroorganizmy przygotowane w formie biopreparatu lub też namnożone mikroorganizmy autochtoniczne z danego terenu, jeżeli takie występują, ale wprowadzone w większej ilości i z dodatkowymi substancjami odżywczymi stymulującymi ich wzrost.

Procesu bioremediacji może wspomagać zastosowanie środków powierzchniowo czynnych. Dodatkowe wprowadzenie do układu związków powierzchniowo czynnych w istotny sposób może przyspieszyć skuteczność biodegradacji zanieczyszczeń organicznych [6-11]. Dodawanie surfaktantów ma na celu emulgowanie węglowodorów i ułatwienie tym samym kontaktu z mikroorganizmami. Wprowadzony surfaktant modyfikuje właściwości powierzchniowe komórki. Modyfikacja ta może odbywać się poprzez adsorpcję surfaktantu na po-

wierzchni i zwiększenie hydrofobowości komórki lub poprzez zwiększenie przepuszczalności membrany. W ostatnich latach na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie surfaktantów naturalnych, a wśród nich biosurfaktantów wytwarzanych przez mikroorganizmy. Ze względu na swoje emulgujące właściwości mogą być wykorzystywane do zwiększania degradacji węglowodorów w środowisku. Wprowadzenie związku powierzchniowo czynnego pobudza rodzime mikroorganizmy do degradacji węglowodorów, znacznie bardziej niż w przypadku dodania tylko samej substancji odżywczych [10]. Prowadzone badania nad mechanizmem wzajemnego oddziaływania pomiędzy najczęściej opisywanym biosurfaktantem - ramnolipidem a powierzchnią komórki *Pseudomonas* ujawniły, że kontakt z ramnolipidami powoduje uwolnienie lipopolisacharydów (LPS), co prowadzi do wzrostu hydrofobowości powierzchni komórki [12]. Do zwiększenia rozpuszczalności węglowodorów w wodzie wymagana jest znacznie większa ilość emulgatora, niż do zmiany powierzchni komórki. Powierzchnia komórki bakteryjnej stanowi kontakt ze środowiskiem zewnętrznym



i odgrywa fundamentalną rolę w jej ogólnej fizjologii. Zewnętrzna struktura komórki jest odpowiedzialna za procesy wymiany, oddziaływanie z czynnikami immunologicznymi oraz mającymi wpływ na wzrost i podziały komórkowe, a także na adhezję do różnych powierzchni [13]. Badania nad adhezją mikroorganizmów w układzie faza wodna – powierzchnia ciała stałego od wielu lat cieszą się dużym zainteresowaniem. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż mechanizm adhezji w zdecydowanej mierze opiera się na właściwościach hydrofobowych komórki, które są uznawane za czynnik wirulencji [14]. Trwała adhezja komórek mikroorganizmów do różnych powierzchni zależy od hydrofobowości powierzch-

ni komórki. Oznacza to, że te same właściwości hydrofobowe będą miały również wpływ na charakter oddziaływań komórek mikroorganizmów z substancjami hydrofobowymi, jakimi są węglowodory. Hydrofobowość jest dynamiczną własnością komórek, która może ulegać zmianom w odpowiedzi na warunki stawiane przez środowisko zewnętrzne. Cecha ta jest wynikiem oddziaływania „hydrofobin”, czyli związków promujących hydrofobowość i „hydrofilin”, które obniżają hydrofobowość, współwystępujących na powierzchni komórki. Liczba zewnątrzkomórkowych, makromolekularnych komponentów może być reprezentowana przez różne grupy funkcyjne [15].

Wielu badaczy próbuje opisać

bakteryjną adhezję uwzględniając liczne parametry charakteryzujące powierzchnię komórki takie, jak hydrofobowość, energia powierzchniowa i elektrostatyczne interakcje cząstek komórkowych z powierzchniami. Względna hydrofobowość komórek bakteryjnych może być określana za pomocą różnych metod, do których należą: mikrobiologiczna adhezja do węglowodorów (Microbial Adhesion to Hydrocarbon - MATH) [16], chromatografia hydrofobowych oddziaływań (Hydrophobic Interaction Chromatography - HIC), agregacja w obecności różnych stężeń soli (Salt Aggregation Test - SAT), adhezja do filtrów nitrocelulozowych (Adhesion of Nitrocellulose Filters - NCF) i kąt zwilżania (Contact Angle Me-

asurements - CAM). Metodą najczęściej wykorzystywaną w badaniach adhezyjnych jest MATH. Podstawą tej metody jest wykorzystanie spektrofotometrii zakresu widzialnego (Vis) do określenia zdolności adhezyjnych mikroorganizmów w stosunku do hydrofobowych źródeł węgla. Obok tej metody, do oceny kontroli wzrostu mikroorganizmów w czasie procesu biodegradacji wykorzystuje się pomiar gęstości optycznej wykonywany w zakresie światła widzialnego. Pomiar ten umożliwia również w prosty i szybki sposób na określenie toksyczności różnych związków. Interesującym zagadnieniem jest także pomiar wielkości i geometrii cząstek oraz określenie polidispersyjności podczas procesu biodegradacji. Takie

**FILTRACJA**  
Sączi jakościowe i ilościowe  
Filtry z mikrowłókien szklanych  
Gilzy celulozowe i szklane  
Filtry dyskowe i kapsułkowe

**MIKROFILTRACJA**  
Filtry strzykawkowe  
Fiolki filtracyjne 0,2 i 0,45 mm  
Membrany filtracyjne

**CHROMATOGRAFIA**  
Bibuly chromatograficzne  
Płytki do TLC  
Kolumny do HPLC

**Whatman**

**AUTORYZOWANY DYSTRYBUTOR**  
**LABO PLUS**  
ul. Obornicka 5, 02-948 Warszawa  
tel. 0-22 6467727, fax 0-22 6467717  
[www.laboplus.pl](http://www.laboplus.pl)

pomiary możliwe są także w zakresie światła widzialnego.

Celem pracy jest przedstawienie metod spektroskopowych oznaczania aktywności mikroorganizmów zdolnych do biodegradacji ropopochodnych: metodę MATH (mikrobiologiczną adhezję do węglowodorów), pomiar gęstości optycznej pozwalający na ocenę wzrostu mikroorganizmów w czasie procesu biodegradacji, jak również na określenie toksyczności różnych związków w stosunku do mikroorganizmów, a także pomiary wielkości i geometrii cząstek oraz określenie polidispersyjności podczas procesu biodegradacji i wskazanie zalet i wad związanych ze stosowaniem tych metod.

## Część eksperymentalna

### 1. Mikrobiologiczna adhezja mikroorganizmów do węglowodorów

Właściwości hydrofobowe powierzchni komórki oceniano testem adhezji do heksadekanu (MATH) według metody Rosenberga i współ. [16]. Hodowlę prowadzono przez 7 dni w obecności glukozy, modelowej mieszaniny węglowodorów, oleju napędowego i surfaktantów oraz w układzie węglowodory-surfaktant. Następnie każdą próbkę wiorowano przy 7000g przez 4 min, otrzymaną w ten sposób biomasę dwukrotnie przemywano i wytrząsano w jałowym buforze PUM o pH 7,2 (19,7 g l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,26 g l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8 g l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>NCONH<sub>2</sub> i 0,2 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O). Uzyskany osad

ponownie zawieszano w 5 ml buforu w celu zmierzenia gęstości optycznej (A<sub>0</sub>). W razie potrzeby zawiesinę rozcieńczano tak, aby wartość absorbancji wynosiła 1,0. Następnie do zawiesiny komórek dodawano 500 μl heksadekanu i wytrząsano na Vortexie przez 2 min przy 2500 obr/min. Po oddzieleniu faz ostrożnie pobierano pipetką Pasteura fazę wodną i mierzono absorbancję (A<sub>1</sub>). Gęstość optyczną mierzono przy długości fali 600 nm na spektrofotometrze UV-Vis, (Shimadzu). Stopień hydrofobowości wyznaczono z zależności (A<sub>0</sub>-A<sub>1</sub>)/A<sub>0</sub>\*100[%]. Wynik każdego z eksperymentów jest średnią z pięciu prób. Próbą odniesienia była hodowla mikroorganizmów na glukozie.

### 2. Pomiar gęstości optycznej

W celu określenia gęstości optycznej hodowli mikroorganizmów, odpowiadającej ich intensywności wzrostu, po określonym czasie hodowli pobierano w sposób jałowy próbkę o objętości 1,5 ml. Następnie mierzono gęstość optyczną przy długości fali 600 nm na spektrofotometrze UV-Vis, (Shimadzu).

### 3. Rozkład wielkości cząstek

Rozkład wielkości cząstek mierzono na aparacie Zeta-Plus firmy Brookhaven Instruments Co., USA. Pomiaru dokonano po 7 dniach hodowli w układzie: bakterie-glukoza, bakterie-węglowodory, bakterie-olej napędowy, bakterie-surfaktant, bakterie-olej napędowy-surfaktant, bakterie-węglowodory-surfaktant. Analiza każdego roztworu zło-

żona jest z 5 kroków pomiarowych, a ostateczny wynik jest średnią arytmetyczną z 4 wartości.

### 4. Mikroorganizmy i biodegradacja węglowodorów

W eksperymentach wykorzystano środowiskowe szczepy bakterii wyizolowane z gleby skażonej ropą naftową, m.in. z miejsc dawnych odwiertów ropy naftowej z okolic Krygu, Ropicy Polskiej oraz Gorlic z województwa Małopolskiego, stacji benzynowych, rurociągu „Przyjaźń”. Wykorzystano mikroorganizmy z rodzaju: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas* i *Achromobakter*. Przedmiotem badań były także szczepy drożdży z rodzaju *Candida* i *Yarrowia*. Biodegradację węglowodorów wyznaczono w oparciu o normę PN – 86 C – 04573/01.

## Wyniki

### 1. Wpływ toksyczności związków chemicznych na aktywność biologiczną bakterii

Pomiar gęstości optycznej podczas wzrostu mikroorganizmów na różnych źródłach węgla, dostarcza informacji na temat możliwości wykorzystania przez drobnoustroje danego źródła węgla, co jest szczególnie ważne przy selekcjonowaniu szczepów zdolnych do biodegradacji określonego skażenia. Pozwala na określenie czasu adaptacji mikroorganizmów do danych warunków oraz czas trwania wzrostu logarytmicznego mikroorganizmów. Informacje takie są niezbędne w przy-

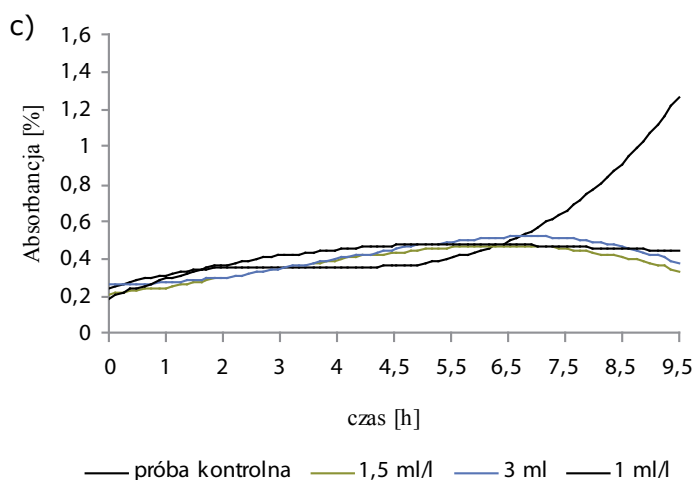
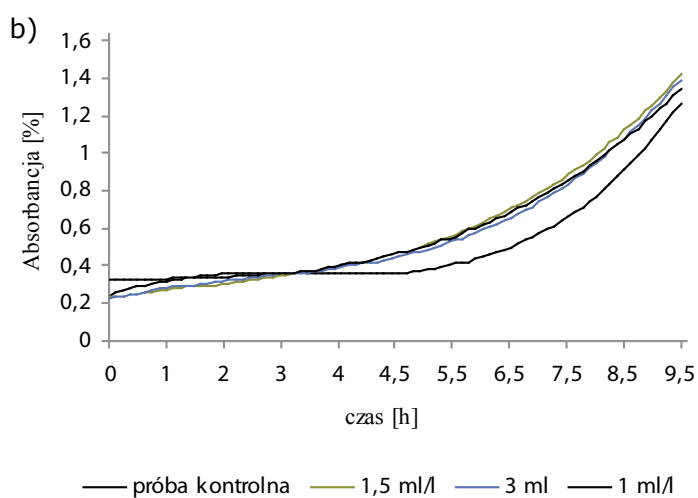
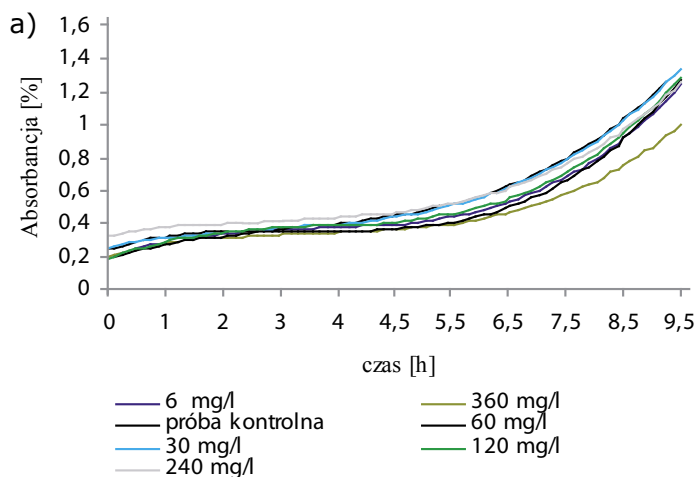
padku prowadzenia hodowli mikroorganizmów. Wzrost mikroorganizmów na glukozie stanowi hodowlę kontrolną, ze względu na to, że glukoza stanowi łatwo przyswajalne źródło węgla dla bakterii. Otrzymanie wartości gęstości optycznej, podczas wzrostu na wybranych źródłach węgla, poniżej wartości uzyskanych dla krzywej wzorcowej, wskazuje na toksyczny wpływ na komórki mikroorganizmów i zahamowanie ich podziałów. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że dla testowanego szczepu *Aeromonas hydrofila*, saponiny w ilości do 240 mg/l nie są toksyczne i mogą stanowić źródło węgla i energii. Toksyczny wpływ saponin zaobserwowano przy stężeniu 360 mg/l (rys. 1 a).

Uzyskane wyniki badań wykazały ponadto, że testowany szczep może wykorzystywać modelową mieszaninę węglowodorów (dodekan i heksadekan) jako źródło węgla dla swojego wzrostu, co świadczy o biodegradacji tych węglowodorów przez szczep *Aeromonas hydrofila* (rys. 1b). Zaobserwowano ponadto, że w przypadku oleju napędowego, nawet najmniejsza jego ilość wpływa toksycznie na komórki mikroorganizmu (rys. 1c).

### 2. Właściwości powierzchniowe mikroorganizmów

#### a) Wpływ węglowodorów na hydrofobowość komórek

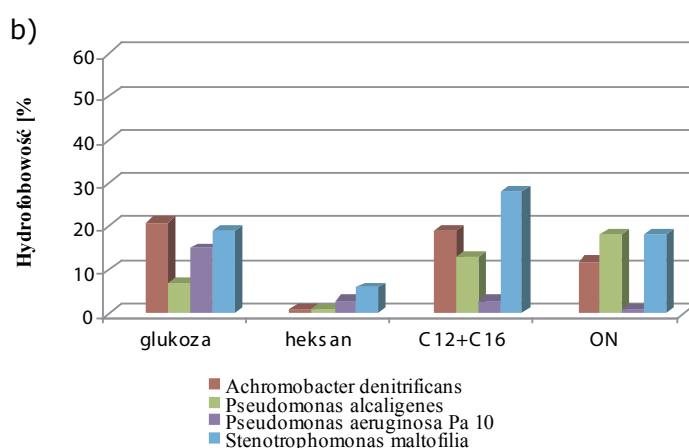
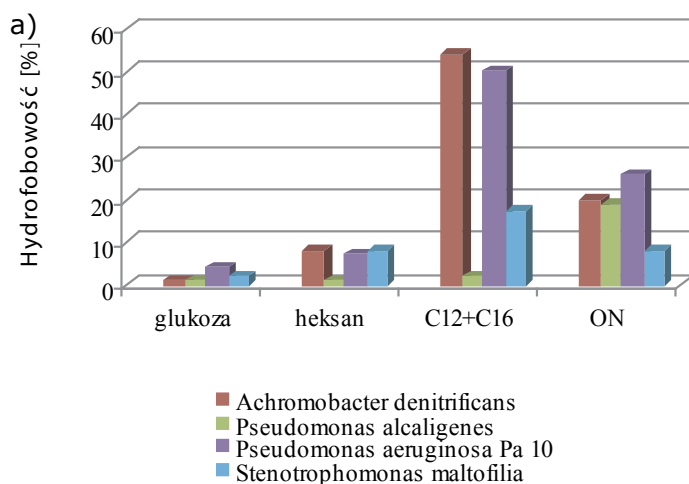
Właściwości powierzchniowe mikroorganizmów (hydrofobowość) zależą od wielu czynników i mogą się zmieniać w trakcie przechowywania drobnoustrojów. Przyjęto, że



Rys. 1. Aktywność biologiczna szczepu *Aeromonas hydrophila* w obecności: saponin (a), mieszaniny węglowodorów C<sub>12</sub> + C<sub>16</sub> (b), oleju napędowego (c)

jako powierzchnie hydrofobowe przyjmuje się gdy wartość hydrofobowości jest ponad 30-50%, a powierzchnie o charakterze hydrofilowym określa

wymi powierzchniami gdy wartość ta jest w granicach 30-50%, a powierzchnie o charakterze hydrofilowym określa

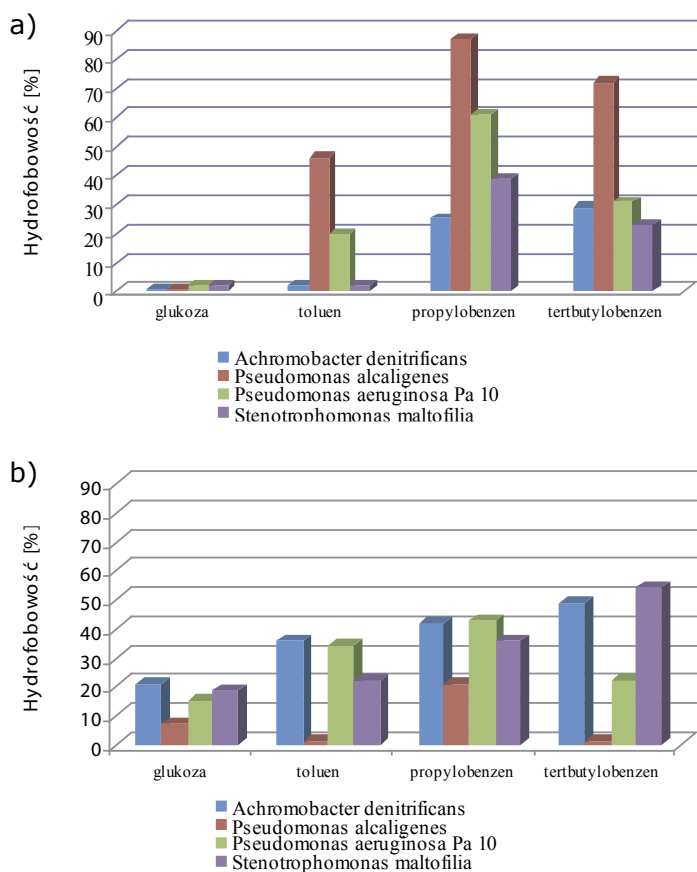


Rys. 2. Wpływ źródła węgla na hydrofobowość mikroorganizmów przechowywanych na agarze odżywczym (a), na agarze z dodatkiem C<sub>12</sub>+C<sub>16</sub> (b); ON - olej napędowy

się powierzchnie o hydrofobowości poniżej 30%.

Badania prowadzone dla szczepów: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Pseudomonas alcaligenes* hodowanych i namnażanych na podłożu standardowym wykazały, że wartość stopnia hydrofobowości jest warunkowana różnymi czynnikami. Jednym z czynników jest niewątpliwie rodzaj dodawanego do hodowli źródła węgla glukozy, spowodowało, że powierzchnia wszystkich testowanych szczepów posiadała cechy hydrofilowe.

Glukoza jest substancją łatwo wykorzystywaną przez mikroorganizmy. Drobnoustroje nie potrzebują wykorzystania własnej energii metabolicznej do jej transportu przez ścianę i błonę komórkową (rys. 2 i 3). Przechowywanie mikroorganizmów na agarze z dodatkiem C<sub>12</sub>+C<sub>16</sub> wpłynęło na właściwości powierzchniowe, które wzrosły w stosunku do bakterii przechowywanych na agarze odżywczym (rys. 2). Hydrofilowy charakter powierzchni komórek zaobserwowano także dla wszystkich szczepów wzrastających na heksanie. Zaobserwowano, że największe

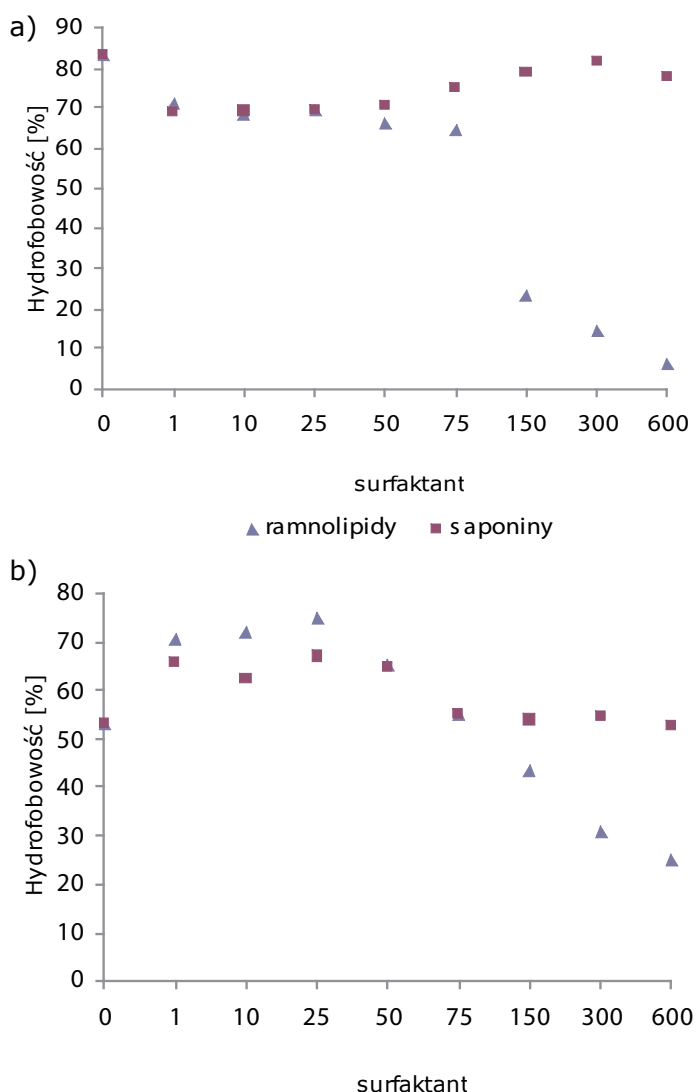


Rys. 3. Wpływ źródła węgla na hydrofobowość mikroorganizmów przechowywanych na agarze odżywczym (a), na agarze z dodatkiem C12+C16 (b)

szy wpływ na modyfikację powierzchni w kierunku cech bardziej hydrofobowych miały węglowodory aromatyczne: propylobenzen i tertbutylobenzen (rys. 3). Największe zmiany zaobserwowano u bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, które posiadały wyraźnie hydrofobowy charakter powłoki zewnętrznej. Przechowywanie szczepów na agarze z dodatkiem C12+C16 spowodowało obniżenie hydrofobowości powierzchni komórek w obecności węglowodorów aromatycznych (rys. 3). Pozostałe dwa szczepy charakteryzowały się cechami hydrofilowo-hydrofobowymi podczas wzrostu na wymienianych wyżej węglowodorach aromatycznych.

**b) Wpływ surfaktantów na hydrofobowość komórek**

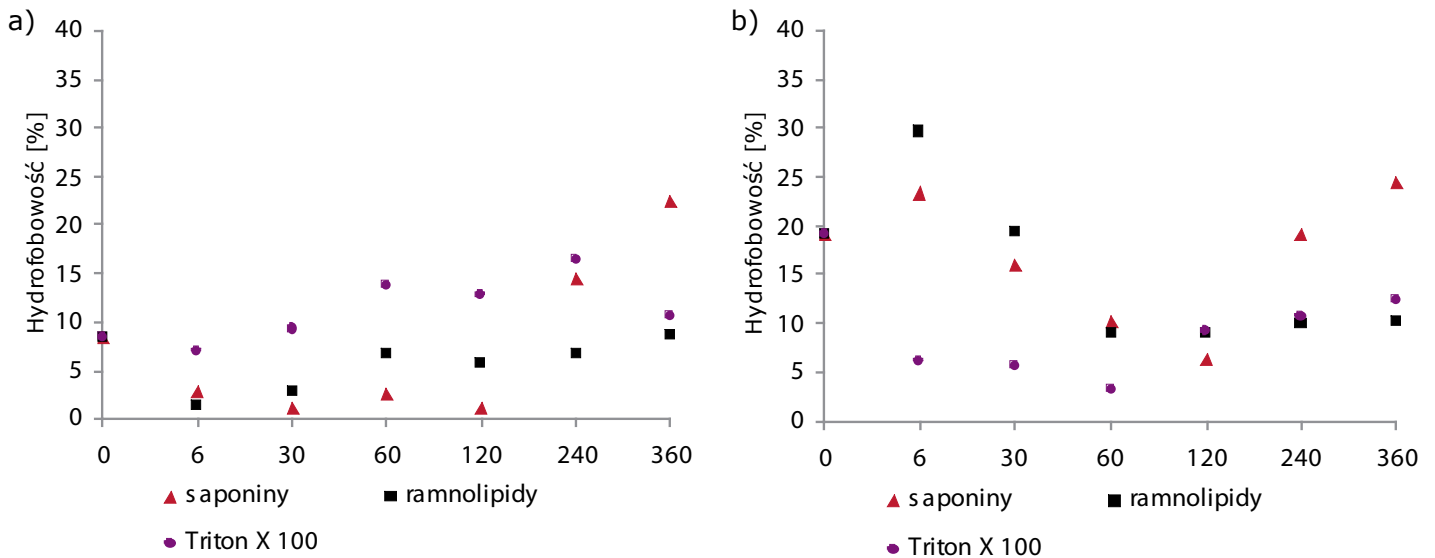
Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że rodzaj dodawanego surfaktantu, jak i jego stężenie ma wpływ na modyfikację powierzchni komórek szczepu *Candida maltosa* EH 15, *Candida maltosa* EH 60 i *Pseudomonas alcaligenes* (rys. 4 i 5). Ponadto wprowadzenie surfaktantów do układu z węglowodorami powoduje odmienną modyfikację powierzchni komórek testowanego szczepu, w porównaniu do układu z samym surfaktantem (rys. 5b). W przypadku zastosowania saponin w całym zakresie stężeń zaobserwowano diametralnie odmienne zachowanie niż w przypadku ramnolipidów. Zmiany hydro-



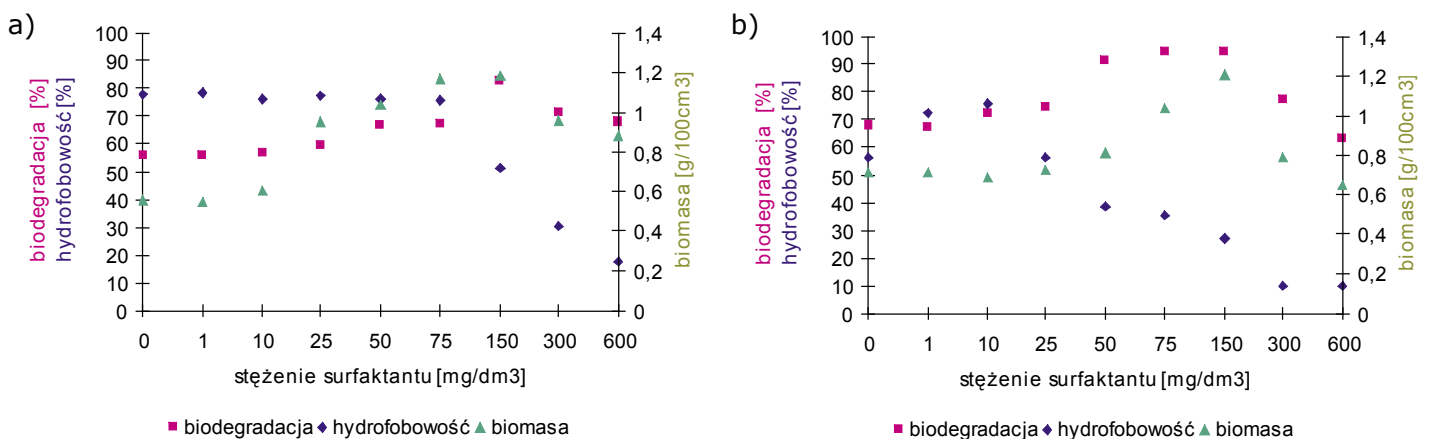
Rys. 4 Wpływ ramnolipidów i saponin na hydrofobowość powierzchni komórek szczepu *Candida maltosa* EH 15 (a) i *Candida maltosa* EH 60 [17]

fobowości w miarę wzrostu stężenia surfaktantu są nieznaczne, oscylują w granicach stałej wartości w całym zakresie stężeń, w jakich zastosowano związek powierzchniowo czynny. Nie różnią się od wartości hydrofobowości prezentowanej przez poszczególne szczepy hodowane w obecności samych tylko węglowodorów. Podsumowując można zauważyć, że dane źródło węgla modyfikuje w różnym stopniu powierzchnię mikroorganizmów. Wpływ ten związany

jest zarówno z przynależnością do danego rodzaju, a nawet gatunku, jak również od zdolności tych mikroorganizmów do wykorzystywania hydrofobowych źródeł węgla. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że hydrofobowość jest wartością dynamiczną, która zmienia się w czasie prowadzenia procesu biodegradacji i wiele czynników ma na nią wpływ. Metoda mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów jest powszechnie wykorzystywana w tego typu badaniach, jest ona pro-



Rys. 5. Hydrofobowość powierzchni szczepu *Pseudomonas alcaligenes* w układzie surfaktanty (a) i surfaktanty-węglowodory (b) [18]



Rys. 6. Wpływ ramnolipidów na biodegradację i hydrofobowość powierzchni komórek szczepu *Candida maltosa* EH 15 (a) i *Candida maltosa* (b) EH 60 [18]

sta w wykonaniu i stosunkowo szybka, nie mniej jednak uzyskane wyniki przedstawiają zdolności adhezyjne mikroorganizmów w danej chwili eksperymentu.

**c) Hydrofobowość a biodegradacja węglowodórów**

Analizując wyniki uzyskane w procesie biodegradacji w obecności ramnolipidów można zauważyć duże podobieństwo zależności hydrofobowości i biodegradacji od stężenia ramnolipidów (rys.

6). Przy niskich stężeniach dodanego biosurfaktantu hydrofobowość komórek drożdży pozostaje niezmienną lub nieznacznie wzrasta. Przy dalszym wzroście stężenia surfaktantu hydrofobowość gwałtownie maleje. Zaobserwowano także, że spadkowi właściwości hydrofobowych towarzyszy wzrost stopnia biodegradacji.

Natomiast w przypadku zastosowania saponin nie obserwuje się podobnych zależności, bowiem saponiny odmiennie

zachowują się w takim układzie; nie adsorbują się na powierzchni mikroorganizmów a działanie ich polega na zmianie przepuszczalności błony komórkowej (rys. 7).

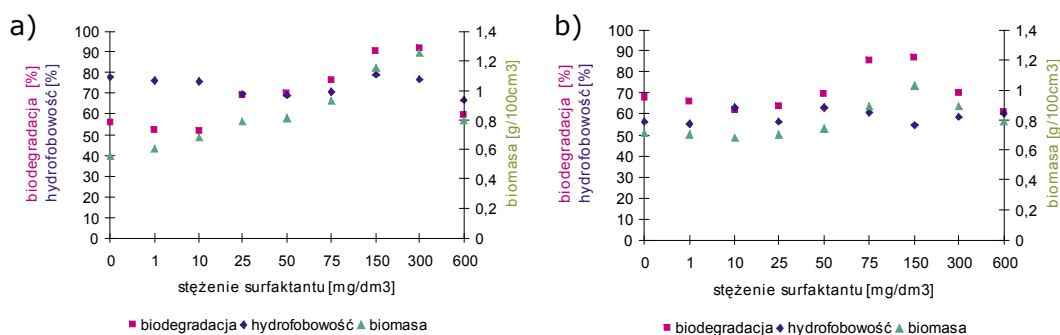
Pomiar hydrofobowości przydatny w ocenie powierzchni czystych szczepów, nie zdaje egzaminu w przypadku konsorcjum drobnoustrojów, ze względu na to, że uzyskany wynik jest wypadkową hydrofobowości szczepów wchodzących w skład konsorcjum (tabela 1).

**4. Rozkład wielkości cząstek**

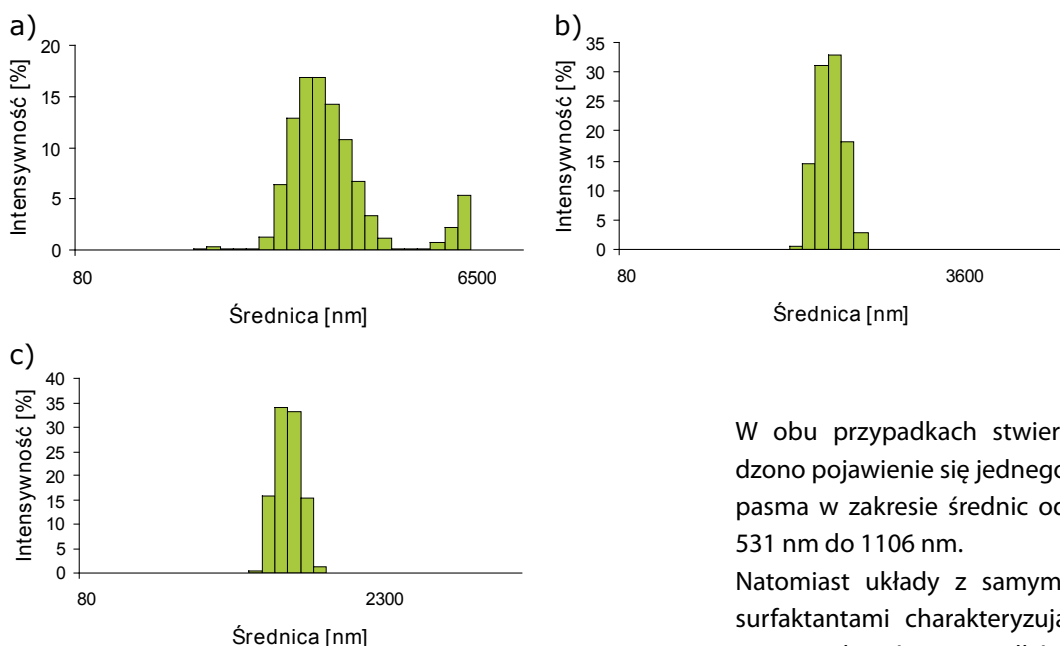
Polidispersyjność oraz rozkład wielkości cząstek badanego szczepu zależą od zastosowanego źródła węgla (tab. 2 i rys. 8). Na wykresie rozkładu wielkości cząstek badanego szczepu, którego hodowlę prowadzono na glukozie, zauważono jedno pasmo w zakresie średnic od 259 nm do 5560 nm (rys. 8a). Maksymalna intensywność w tym zakresie jest dla cząstek 955 oraz 1106 nm, która wynosi 16,9%. Zkolei hodowlę wzrastającą na

Tabela. 1. Biodegradacja oleju napędowego przez konsorcja bakteryjne B1 (*P. fluorescens* P1, *P. putida* K1 i *Pseudomonas* spp.) oraz hydrofobowość testowanych układów [19]

UKŁAD	BIODEGRADACJA [%]	HYDROFOBOWOŚĆ [%]
	KONSORCJUM B1 ( <i>P. fluorescens</i> P1, <i>P. putida</i> K1 i <i>Pseudomonas</i> spp.)	
węglowodory	31,8 ± 1,8	46,2 ± 1,4
węglowodory + ramnolipidy	45,7 ± 1,0	37,3 ± 1,9
węglowodory + saponiny	78,3 ± 2,3	26,8 ± 1,1
węglowodory + Triton X-100	46,2 ± 1,4	39,8 ± 2,8



Rys. 7. Wpływ saponin na biodegradację i hydrofobowość powierzchni komórek szczepu *Candida maltosa* EH 15 (a) i *Candida maltosa* EH 60 (b) [17]



Rys. 8. Rozkład wielkości cząstek szczepu *Pseudomonas stutzeri* w zależności od źródła węgla: (a) glukozy, (b) oleju napędowego, (c) węglowodorów

oleju napędowym i modelowej mieszance węglowodorów C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub> charakteryzowały się większą jednorodnością cząstek, o czym świadczy niska polidispersyjność wynosząca dla tych hodowli odpowiednio 0,145 i 0,152 (tab. 2).

Wprowadzenie do układu węglowodorów surfaktantów, powoduje wzrost polidispersyjności układu. Wysoka wartość polidispersyjności świadczy o tendencji do aglomeracji. Wyjątek stanowi układ przy stężeniu 120 mg/l, gdzie uzyskano niższą wartość polidispersyjności niż w układzie ramnolipidy-bakterie. Stężenie to jest optymalne dla biodegradacji węglowodorów z dodatkiem ramnolipidów. Obserwuje się wówczas największą biodegradację węglowodorów.

**Podsumowanie**

Przedstawione metody spektroskopowe, wykorzystujące światło w zakresie widzialnym, do oznaczania aktywności powierzchniowej mikroorganizmów metodą MATH (mikrobiologiczną adhezję do węglowodorów), a także bardzo prosta technika pomiaru gęstości optycznej pozwalają na ocenę wzrostu mikroorganizmów w czasie procesu biodegradacji, jak również na określenie toksyczności różnych związków w stosunku do mikroorganizmów. Otrzymane wyniki są przydatne w badaniach nad biodegradacją substancji toksycznych np. skażeń wywołanych związkami ropopochodnymi. Są to metody łatwe do wykonania, powszechnie stosowane ale o ograniczony zastosowaniu. Wykorzystanie metody MATH do oznaczania aktywności powierzchniowej mikroorganizmów jest celowe dla układów pojedyncze szczepy mikroorganizmów-surfaktant oraz pojedyncze szczepy mikro-

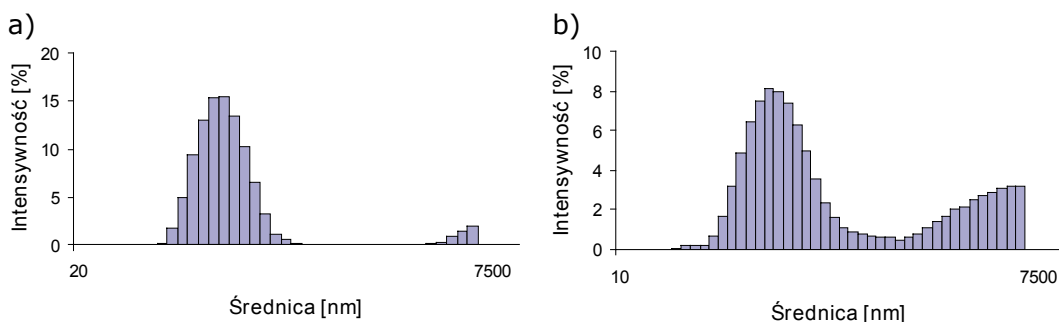


Tabela 2. Polidispersyjność próbki szczepu *Pseudomonas stutzeri* w zależności od różnego źródła węgla

Źródło węgla	Polidispersyjność
glukoza	0,481
olej napędowy	0,145
węglowodory	0,152

organizmów-węglowodory. Natomiast uzyskane wartości hydrofobowości dla układów konsorcjum drobnoustrojów, są wartościami wypadkowymi i nie są przydatne przy ocenie wpływu właściwości powierzchniowych na biodegradację. Przedstawione w pracy

wyniki pomiarów wielkości i geometrii cząstek oraz określenie polidispersyjności podczas biodegradacji węglowodorów są interesujące i mogą zostać wykorzystane do oceny procesów zachodzących w czasie biodegradacji. Wymagają one dodatkowych badań.



Rys. 9. Rozkład wielkości cząstek w układzie bakterie-węglowodory-ramnolipidy dla różnych stężeń surfaktanta: a) 120 mg/l, b) 360 mg/l

Tabela 3. Polidispersyjność układów bakterie-surfaktant w zależności od zastosowanego surfaktanta i jego stężenia

UKŁAD	POLIDYSPERSYJNOŚĆ					
	Stężenie surfaktanta [mg/l]					
	6	30	60	120	240	360
bakterie-Triton-X-100	0,070	0,157	0,133	0,061	0,104	0,120
bakterie-ramnolipidy	0,152	0,176	0,178	0,421	0,204	0,213
bakterie-saponiny	0,051	0,217	0,236	0,386	0,285	0,167

Tabela 4. Polidispersyjność układów bakterie-surfaktant, bakterie-olej napędowy-surfaktant, bakterie-węglowodory-surfaktant w zależności od różnych stężeń ramnolipidów

UKŁAD	POLIDYSPERSYJNOŚĆ					
	Stężenie surfaktanta [mg/l]					
	6	30	60	120	240	360
bakterie-ramnolipidy	0,152	0,176	0,178	0,421	0,204	0,213
bakterie-węglowodory-ramnolipidy	0,632	0,360	0,975	0,250	0,237	0,578

**Literatura:**

[1] M.K. Błaszczak, Mikroorganizmy w ochronie środowiska, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.  
 [2] R.L. Crawford, D.L. Crawford, Bioremediation. Principles and Applications, Cambridge University Press 1996.  
 [3] J.T. Dibble, R. Bartha, Appl. Environ. Microbiol., 37 (1979) 729.  
 [4] O. Obire, O. Nwaubeta, J. Appl. Sci. Environ. Mgt., 5 (2001)43.  
 [5] G.I. Vecchioli, M.T. Del Panno, M.T. Paineira, Environmen. Pollut., 67 (1990) 249.  
 [6] L. Laouar, K. Lowe, B. Muligan, Enzyme Microbial Tech-

noł., 18 (1996) 433.  
 [7] S. Owen, N. Russell, A. House, Microbiology, 143 (1997) 3649.  
 [8] C.J., Soeder, A. Papademos, M. Kleespies, H. Kneifel, Appl Microbiol Biotechnol. 44 (1996) 654.  
 [9] D.S. Jones, C.G. Adair, W.M. Mawhinney, S.P. Gorman, Int. J. Pharm., 131 (1996) 83.  
 [10] Y. Zhang, R.M. Miller, Appl. Environ. Microbiol., 60 (1994) 2101.  
 [11] Y. Zhang, R.M. Miller, Appl. Environ. Microbiol., 60 (1994) 2101.  
 [12] J.M. Foght, D.L. Gutnick, D.W.S. Westlake, Appl. Environ. Microbiol., 55 (1989) 36.  
 [13] W.W. Wilson, M.M. Wade, S.C. Holman, F.R. Champlin, J. Microbiol. Method., 43 (2001) 153.  
 [14] R.J. Doyle, Microb. Infect., 2 (2000) 391.  
 [15] K.A. Strevett, G. Chen, Res. Microbiol., 154 (2003) 329.  
 [16] M. Rosenberg, D. Gutnick, E. Rosenberg, FEMS Microbiol. Lett., 9 (1980) 29.  
 [17] Ł. Chrzanowski, E. Kaczorek, A. Olszanowski, Pol. J. Environ. Stud., 15 (2006) 47.  
 [18] E. Kaczorek, S. Moszyńska, A. Olszanowski, Biodegradation, (2010), DOI 10.1007/s10532-010-9406-4.  
 [19] E. Kaczorek, A. Olszanowski, 2010, Water Air Soil Pollut, (2010) DOI 10.1007/s11270-010-0436-7.

**Praca była finansowana z BW 32-003/2010.**

\*E. Kaczorek, A. Olszanowski - Politechnika Poznańska, Wydział Technologii Chemicznej, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Pl. Marii Skłodow-skiej-Curie 2, 60-965 Poznań