

Barbara Kolwzan

Możliwości wykorzystania biosurfaktantów w technologiach oczyszczania środowiska gruntowo-wodnego

Surfaktanty to substancje charakteryzujące się zdolnością do adsorpcji na granicy faz oraz wywieraniem wpływu na właściwości powierzchniowe cieczy, w których są rozpuszczone. Ich szerokie praktyczne zastosowanie wynika ze specyficznych zdolności zwilżających, dyspergujących, pianotwórczych, emulgujących, piorących oraz myjących. Odbiorcami preparatów zawierających surfaktanty są różne gałęzie przemysłu (włókienniczy, papierniczy, skórzanym, metalowy, tworzyw sztucznych, przemysł kosmetyczny, spożywczy, farmaceutyczny, naftowy oraz górnictwo), a także gospodarstwa domowe, rolnictwo i szeroko pojęta inżynieria środowiska [1–5].

Produkcja surfaktantów na świecie stale rośnie i znajdują one coraz szersze zastosowania. Wiąże się z tym zjawiska niekorzystne wynikające z ich obecności w ściekach odprowadzanych do środowiska wodnego i gruntowego. Są to związki o właściwościach toksycznych, stanowiące poważne zagrożenie dla organizmów glebowych i wodnych, a także dla człowieka. Właściwości fizyczno-chemiczne surfaktantów sprzyjają ich rozprzestrzenianiu w środowisku gruntowo-wodnym. Pokrywając powierzchnię wody utrudniają dyfuzję tlenu, powodując obumieranie organizmów żywych. Ponadto przyczyniają się do zmniejszenia zdolności zawieszin do opadania, utrudniając w ten sposób proces samooczyszczania, a także działają jako emulgatory różnych substancji hydrofobowych (np. olejów, smarów), co w niektórych przypadkach może prowadzić do zwiększenia ich toksyczności [6].

Ograniczenie lub minimalizację tego typu zagrożeń można osiągnąć stosując preparaty ulegające biodegradacji oraz o małej toksyczności. Najnowszym kierunkiem w tej dziedzinie jest wykorzystanie naturalnych związków powierzchniowo czynnych, tzw. biosurfaktantów, które są produkowane przez mikroorganizmy, a także organizmy roślinne czy zwierzęce. Preparaty tego typu, stosowane w przemyśle spożywczym czy farmaceutycznym, muszą charakteryzować się dużą czystością, stąd też barierą w ich powszechnym wykorzystaniu są ciągle jeszcze wysokie koszty produkcji [1, 5]. Szczególnie zainteresowanie budzi możliwość zastosowania biosurfaktantów w procesach remediacji wód i gruntów skażonych hydrofobowymi związkami organicznymi, a także pierwiastkami śladowymi, gdzie stopień czystości preparatów nie musi być wysoki; można nawet wykorzystywać hodowle mikroorganizmów wytwarzających tego typu związki [2].

Duże nadzieje wiąże się z możliwością stosowania biosurfaktantów do stymulacji procesu biodegradacji produktów naftowych w środowisku gruntowo-wodnym. Biodostępność węglowodorów ograniczona jest ich rozpuszczalnością w wodzie oraz tendencją do adsorbowania na częściach stałych gleby. Silną adsorpcją do materiału glebowego charakteryzują się polichlorowane węglowodory oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Tempo ich biodegradacji nie jest ograniczone aktywnością mikroorganizmów, lecz ich wolną desorpcją i przechodzeniem do fazy wodnej. Wykazano, że biosurfaktanty mogą stymulować biodegradację hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych [2, 7]. Ich główną zaletą jest duża skuteczność działania, brak toksyczności oraz podatność na biodegradację. Wielu badaczy wskazuje również na możliwość wykorzystania biosurfaktantów w technologiach oczyszczania gruntów skażonych metali śladowych [2, 3, 8]. Dzięki mechanizmom desorpcji i kompleksowania zwiększają one zawartość jonów metali w roztworze glebowym i ułatwiają ich usuwanie z gruntu na drodze tzw. mycia. Zastosowanie biosurfaktantów w inżynierii środowiska wydaje się bezpieczne z ekologicznego punktu widzenia [9, 10].

Charakterystyka biosurfaktantów

Największą grupę poznanych dotychczas biosurfaktantów stanowią związki pochodzenia mikrobiologicznego produkowane przez bakterie i grzyby [7, 9, 10]. Znajdują się one wewnątrz komórek drobnoustrojów, na ich powierzchni lub też są wydzielane pozakomórkowo. Biosurfaktanty, podobnie jak surfaktanty syntetyczne, wykazują aktywność powierzchniową w roztworach wodnych, co przejawia się w zdolności do adsorpcji na granicy faz o różnej polarności, obniżaniu napięcia powierzchniowego oraz międzyfazowego, a także zdolności tworzenia oraz stabilizowania emulsji i piany [11]. Biosurfaktanty mogą obniżyć napięcie powierzchniowe wody z 72 mN/m do poniżej 30 mN/m [2]. Charakteryzują się budową amfifilową, a więc ich cząsteczki zawierają część hydrofilową wykazującą powinowactwo do substancji polarnych oraz część hydrofobową wykazującą duże powinowactwo do cieczy niepolarnych oraz brak powinowactwa do wody. Stosunek części hydrofobowej do hydrofilowej w biosurfaktancie, czyli równowagę hydrofilowo-lipofilową, określa wartość liczby HLB (hydrophilic-lipophilic balance), zmieniająca się w zakresie od 0 do 40 [12]. Biorąc pod uwagę ładunek części hydrofilowej wyróżnia się surfaktanty jonowe i niejonowe. Część hydrofilową, decydującą o rozpuszczalności

biosurfaktantów w wodzie, stanowią najczęściej węglowodany, aminokwasy, cykliczne peptydy, alkohole, estry, grupy fosforanowe, karboksylowe, hydroksylowe, sulfonowe i inne. Grupa hydrofobowa biosurfaktantów zbudowana jest z białek, peptydów oraz najczęściej z długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, hydroksykwasów tłuszczowych lub α -alkilo- β -hydroksykwasów tłuszczowych [2]. Część hydrofobowa surfaktantu może być połączona z częścią hydrofilową wiązaniem estrowym, glikozydowym, amidowym lub laktonowym [5]. Poznane dotąd biosurfaktanty należą głównie do grupy związków niejonowych lub anionowych, jakkolwiek w kilku przypadkach stwierdzono obecność ugrupowań zawierających azot, nadających kationowy charakter części cząsteczki [2, 13].

Podstawą klasyfikacji poznanych dotąd biosurfaktantów mikrobiologicznych jest ich budowa chemiczna (tab. 1) [13–17]. Wyróżnia się biosurfaktanty wielkocząsteczkowe, będące głównie związkami polimerowymi (lipopolisacharydy, mannoproteiny) oraz małowcząsteczkowe (glikolipidy, lipopeptydy, fosfolipidy i neutralne lipidy) [18, 19]. Biosurfaktanty małowcząsteczkowe są bardziej skuteczne w obniżaniu napięcia powierzchniowego i międzyfazowego, ale ich aktywność emulgacyjna jest niska. Biosurfaktanty wielkocząsteczkowe skutecznie stabilizują emulsje typu olej w wodzie, natomiast wykazują minimalną zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego. Masa cząsteczkowa biosurfaktantów małowcząsteczkowych nie przekracza 1500 Da, natomiast wielkocząsteczkowych może dochodzić do 1000 kDa [2, 8].

Większość poznanych dotychczas biosurfaktantów to glikolipidy. Zbudowane są z lipidu i jednostki cukrowej, którą najczęściej jest trehaloza, soforoza, ramnoza, celobioza czy glukoza. Cząsteczki mono- lub disacharydu połączone są wiązaniem glikozydowym z kwasem hydroksytłuszczowym. Dobrze poznane zostały ramnolipidy produkowane przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, ale wykryto je również w hodowlach bakterii z rodzajów *Acinetobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Enterobacter* czy *Pantoea*. Warto zwrócić uwagę na fakt, że glikolipidy wykazują właściwości antymikrobiologiczne i przeciwnowotworowe. Mechanizm ich antynowotworowego działania polega na hamowaniu angiogenezy i indukowaniu apoptozy. Soforolipidy i ich strukturalne analogi wykazują właściwości bakteriobójcze i wirusobójcze [1, 17, 20].

Kwasy tłuszczowe i fosfolipidy produkowane są przez niektóre bakterie i drożdże podczas wzrostu na n-alkanach. Ich szczególną cechą jest zdolność do wytwarzania mikroemulsji n-alkanów w wodzie. Fosfolipidy zbudowane są najczęściej z glicerolu i połączonych z nim wiązaniem estrowym dwóch kwasów tłuszczowych i reszty fosforanowej. Są obecne w każdej komórce jako składnik błony komórkowej, ale mogą być również produkowane na zewnątrz komórki (np. przez *Corynebacterium lepus*). Lipidy obojętne, często produkowane pozakomórkowo przez mikroorganizmy rozkładające węglowodory, charakteryzują się dużą aktywnością powierzchniową [17].

Lipopeptydy zbudowane są z kwasu tłuszczowego i przyłączonego do niego cyklicznego łańcucha peptydowego (w ich cząsteczce mogą występować D- i L-aminokwasy). Należą do biosurfaktantów produkowanych przez bakterie i grzyby oraz charakteryzujących się wysoką aktywnością powierzchniową i działaniem antybiotycznym. Do wytwarzania lipopeptydów zdolne są niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus* (subtilizyna, surfaktyna, iturina, fengicyna) oraz *Pseudomonas* (wiskozyne). Niektóre lipopeptydy

Tabela 1. Główne klasy biosurfaktantów i mikroorganizmy produkujące biosurfaktanty [13, 17]

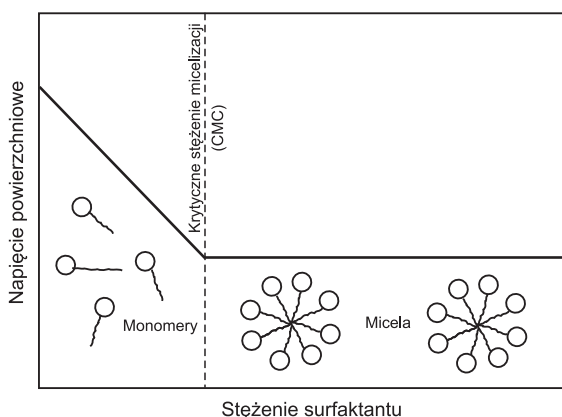
Table 1. Major classes of biosurfactants and biosurfactant-producing microorganisms [13, 17]

Klasa	Biosurfaktant	Producent
Glikolipidy	ramnolipidy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BI
		<i>Pseudomonas</i> spp. P-17
	trehalozolipidy	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
		<i>Arthrobacter paraffineus</i>
		<i>Nocardia erythropolis</i>
		<i>Nocardia</i> spp. SFC-D
	soforolipidy	<i>Torulopsis bombicola</i>
<i>Candida (Torulopsis) apicola</i>		
glukolipidy	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	
Kwasy tłuszczowe, neutralne lipidy i fosfolipidy	kwasy tłuszczowe	<i>Corynebacteria lepus</i>
	neutralne lipidy	<i>Nocardia erythropolis</i>
	fosfolipidy	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Lipopeptydy i lipoproteiny	surfaktyna	<i>Bacillus subtilis</i>
	streptofaktyna	<i>Streptomyces tendae</i>
	subtilizyna	<i>Bacillus subtilis</i>
	wiskozyne	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	gramicydyna	<i>Bacillus brevis</i>
	polimyksyna	<i>Bacillus polymyxa</i>
	serrawetyna	<i>Serratia marcescens</i>
lichenizyna	<i>Bacillus licheniformis</i>	
Biosurfaktanty polimerowe	emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	biodyspersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	lipomanan	<i>Candida tropicalis</i>
	liposan	<i>Candida lipolytica</i>
	węglowodano-proteino-lipid	<i>Debaryomyces polymorphis</i>
	bioemulsan BS29	<i>Gordonia</i> spp. BS29
Biosurfaktanty cząsteczkowe	czynnik PM	<i>Pseudomonas marginalis</i>
	fimbrie, pęcherzyki błonowe (OMV)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	całe komórki	<i>Cyanobacteria</i>

mają właściwości przeciwnowotworowe. Należy do nich surfaktyna produkowana przez bakterie z rodzaju *Bacillus*, której przypisuje się zdolność do hamowania raka piersi, natomiast polimyksyny i gramicydyny od dawna znajdują zastosowanie jako antybiotyki [1, 13].

Niektóre mikroorganizmy mają zdolność wytwarzania polimerowych surfaktantów zbudowanych z białek, polisacharydów, lipopolisacharydów lub mieszaniny tych biopolimerów. Lipopolisacharydy należą do biosurfaktantów zewnątrzkomórkowych, są to rozpuszczalne w wodzie emulgatory o dużej masie cząsteczkowej. Wykryto je u bakterii rozkładających węglowodory, np. *Acinetobacter calcoaceticus* (emulsan). Polimerowe surfaktanty produkowane są także przez drożdże z rodzaju *Candida* (liposan) i *Debaryomyces* (mannoproteina). Emulsan już w ilości 0,001%, wykazuje właściwości emulgujące węglowodory w wodzie.

Pojedyncze cząsteczki biosurfaktantów wydzielanych pozakomórkowo, ich dimery lub niewielkie agregaty, występują w roztworach wodnych o małych stężeniach, natomiast wzrost stężenia biosurfaktantu sprzyja łączeniu się cząsteczek tych związków w większe agregaty i tworzenie miceli. W poszczególnych micelach część polarna (hydrofilowa) cząsteczki skierowana jest na zewnątrz w kierunku wody, a hydrofobowa do wnętrza, co eliminuje jej kontakt z wodą. W przypadku każdego biosurfaktantu można wyznaczyć tzw. krytyczne stężenie micelizacji (critical micelle concentration – CMC), które mieści się w granicach $1\div 200\text{ g/m}^3$ [2]. Jest to stężenie, przy którym cząsteczki biosurfaktantu zaczynają łączyć się ze sobą tworząc micelle, a napięcie powierzchniowe osiąga wartość minimalną w określonych warunkach temperatury i środowiska, z którym ciecz się styka. Zdolność surfaktantów do tworzenia miceli przy stężeniach powyżej CMC umożliwia pseudosolubilizację (rys. 1) [9].



Rys 1. Wpływ napięcia powierzchniowego i stężenia biosurfaktantu na tworzenie miceli [9]
Fig. 1. Effect of surface tension and biosurfactant concentration on micelle formation [9]

W roztworach wodnych wytworzone micelle mają hydrofobowy rdzeń, natomiast ich powierzchnia jest zbudowana z fragmentów hydrofilowych. Wzrost przyswajalności węglowodórów wynika z ich przechodzenia do miceli utworzonych przez biosurfaktant, które są następnie rozprowadzane po powierzchni komórki i pobierane przez mikroorganizmy w charakterze substratu pokarmowego [21]. Wykazano, że biosurfaktanty w stopniu wyższym niż surfaktanty syntetyczne przyczyniają się do zwiększenia rozpuszczalności w wodzie alkanów, wielopierścieniowych związków aromatycznych, monoaromatów czy polichlorowanych bifenyli. Okazało się, że nie tylko małowczątkowe biosurfaktanty powodują wzrost rozpuszczalności związków hydrofobowych. Biosurfaktanty polimerowe, takie jak alasan, zwiększają pięcio- a nawet 20-krotnie rozpuszczalność WWA i szybkość ich biodegradacji [13].

Większość biosurfaktantów charakteryzuje znacznie mniejsza wartość CMC w porównaniu do surfaktantów syntetycznych [22, 23]. Niekiedy przejście węglodorów do miceli jest przyczyną zmniejszenia toksyczności zanieczyszczeń i umożliwia ich skuteczną biodegradację [24]. Większą zdolność do solubilizacji mają surfaktanty o dłuższych łańcuchach węglowodorowych (obniżenie CMC i zwiększenie liczby agregacji). Zwiększa ją też dodatek elektrolitu oraz rozpuszczalnych związków organicznych, mających wpływ na wartość CMC i liczbę agregacji. Zdolność do solubilizacji zmniejsza się wówczas, gdy część hydrofobowa cząsteczki jest rozgałęziona, występuje duże stężenie elektrolitu oraz gdy cząsteczka zawiera więcej alkoholi o krótkich łańcuchach węglowodorowych [25].

Zadaniem biosurfaktantów związanych ze ścianą komórkową jest ułatwianie penetracji węglodorów do przestrzeni peryplazmatycznej. Wzrost przyswajalności węglodorów u tych mikroorganizmów może wynikać ze zwiększenia hydrofobowości ich ściany komórkowej na skutek działania związanych z nią biosurfaktantów, takich jak lipidy trehalozowe. Zawarte w błonie komórkowej lipidy umożliwiają adhezję mikroorganizmów do kropli węglodorów, co ułatwia wiązanie i w konsekwencji pasywny transport substratów węglowodorowych do wnętrza komórek mikroorganizmów. Umożliwia to także rozpuszczanie i kolonizację substratu przez mikroorganizmy. Wykazano, że mikroorganizmy łączą się z kroplami tylko tych ciekłych węglodorów, które są rozkładane przez dany szczep. Węglowodory będące ciałami stałymi w obecności biosurfaktantów są natomiast zwilżane i dyspergowane, w wyniku czego zwiększa się ich powierzchnia [11].

Rola biosurfaktantów nie jest jeszcze w pełni poznana. Za jedną z ważnych funkcji fizjologicznych biosurfaktantów produkowanych przez mikroorganizmy uważa się umożliwienie bakteriom i grzybom wykorzystywanie do wzrostu nierozpuszczalnych w wodzie substancji odżywczych [11]. Z wielu badań wynika jednak, że pełnią one także ważną rolę w szeregu procesach fizjologicznych zachodzących w komórkach mikroorganizmów. Biosurfaktanty znajdujące się wewnątrz komórek mikroorganizmów pełnią rolę składników odżywczych, umożliwiają adsorpcję genów oraz sekwestrację związków toksycznych. Wydzielane na zewnątrz lub gromadzone na powierzchni drobnoustrojów związane są z kolonizacją otoczenia oraz tworzeniem biofilmu [26]. Zdaniem wielu autorów produkcja biosurfaktantów znajduje się pod kontrolą *quorum sensing* [13]. Wykazano, że ramnolipidy odpowiedzialne są za mobilność komórek bakteryjnych z wykorzystaniem tzw. ruchu typu rozpełzliwego. Odgrywają ponadto ważną rolę w procesie tworzenia biofilmu oraz w jego dojrzewaniu i są odpowiedzialne za funkcjonalność kanałów transportowych w obrębie biofilmu, które umożliwiają docieranie składników odżywczych i tlenu [26]. Ułatwiają także komórkom odłączanie się od dojrzałego biofilmu i powrót do planktonowego trybu życia [13]. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe biosurfaktantów są czynnikiem chroniącym mikroorganizmy biofilmu przed inwazją i pozwalają ma utrzymanie zajmowanej niszy ekologicznej [27]. W przypadku drobnoustrojów chorobotwórczych są czynnikiem chroniącym przed fagocytozą, a w niektórych przypadkach biorą czynny udział w infekcjach. Właściwości antymikrobiologiczne i antynowotworowe biosurfaktantów dają duże możliwości ich wykorzystania w medycynie i przemyśle farmaceutycznym [1, 19]. Wykryto także, że możliwy jest horyzontalny transport bioemulgatorów (alasan) między komórkami

bakterii należących do różnych gatunków, który odgrywa ważną rolę w zbiorowiskach mikroorganizmów, procesie koagregacji i tworzeniu biofilmu [13].

Unikalne właściwości biosurfaktantów sprawiają, że mogą one z dużym powodzeniem zastępować syntetyczne środki powierzchniowo czynne w różnych gałęziach przemysłu, medycynie, rolnictwie oraz w technologiach oczyszczania wód i gruntów. Cechy decydujące o wyższości biosurfaktantów w stosunku do ich syntetycznych odpowiedników to [10,13]:

- zdolność do bardzo skutecznego obniżania napięcia powierzchniowego i międzyfazowego,
- mała wartość krytycznego stężenia micelizacji, wysoka skuteczność solubilizacji,
- mała wrażliwość na działanie czynników środowiskowych, takich jak temperatura, pH oraz zasolenie,
- wysoka specyficzność działania,
- mała toksyczność,
- podatność na biodegradację przez mikroorganizmy zasiedlające środowisko wodne i glebowe,
- brak kumulacji w organizmach żywych,
- możliwość ich wytwarzania z tanich surowców, w tym także z surowców odpadowych, co obniża koszty produkcji,
- możliwość przeniesienia ich produkcji w miejsce, gdzie odbywa się proces oczyszczania skażonych wód i gruntów (*in situ*).

Produkcja biosurfaktantów to jedno z ważniejszych wyzwań stojących przed współczesną biotechnologią. Ostatecznym efektem musi być wytworzenie skutecznie działającego produktu przy opłacalnych kosztach produkcji. Biosurfaktanty znajdujące się wewnątrz komórek mikroorganizmów lub zaadsorbowane na ich powierzchni są trudne do wyizolowania i ich otrzymywanie łączy się z dużymi kosztami. Z tego punktu widzenia najlepiej do tego celu nadają się mikroorganizmy wydzielające biosurfaktanty pozakomórkowo [28]. Optymalizacja produkcji biosurfaktantów musi uwzględniać fakt, że związki te produkowane są tylko w pewnych fazach wzrostu mikroorganizmów, a wydajność produkcji zależy od warunków hodowli, w tym zawartości składników odżywczych w podłożu, liczebności komórek w podłożu hodowlanym oraz rodzaju i ilości wytwarzanych przez nie produktów ubocznych [19]. Koszty produkcji biosurfaktantów zależą także od wymaganego stopnia oczyszczenia produktu. Biosurfaktanty wykorzystywane w przemyśle spożywczym, kosmetycznym czy farmaceutycznym muszą charakteryzować się wysokim stopniem czystości, a ich produkcja jest droga. Czynnikiem ten nie ma znaczenia w przypadku biosurfaktantów stosowanych w przemyśle naftowym czy w ochronie środowiska. W tym przypadku skala produkcji jest znacznie większa i to także podraża koszty, ale można tu brać pod uwagę produkcję biosurfaktantów w warunkach *in situ*, czyli w miejscu, gdzie jest na nie zapotrzebowanie. Dobrym rozwiązaniem jest też stosowanie do produkcji biosurfaktantów substancji odpadowych z różnych gałęzi przemysłu. Mogą to być oleje pochodzenia roślinnego (rzepakowy, kukurydziany, słonecznikowy, sojowy) odpady z rafinacji olejów, odpady z produkcji cukru spożywczego (melasa), odpady z przemyśłu tłuszczowego (łój, olej ze zwierząt morskich, smalec), odpady z przeróbki ziemniaków, zbóż, nasion jadalnych, serwatka z przemysłu mleczarskiego czy ścieki z gorzelnicy [19,28–30]. Wytwarzanie biosurfaktantów umożliwia zastosowanie w charakterze źródła węgla zarówno substratów węglowodanowych, jak i węglowodorowych

oraz składników lipidowych [7,16,19]. Rodzaj zastosowanego substratu pokarmowego decyduje w dużej mierze o wydajności produkcji biosurfaktantu [7,19].

Obok substratu stanowiącego źródło węgla organicznego, na ilość i jakość produkowanych biosurfaktantów mają wpływ inne składniki podłoża hodowlanego oraz warunki hodowli [5]. Do najważniejszych z nich należą azot, żelazo i magnez. W charakterze źródła azotu wykorzystywane są sole amonowe, mocznik i azotany, przy czym synteza biosurfaktantów rośnie, gdy w podłożu zawarte są niektóre aminokwasy [11]. Zaobserwowano także, że stosunek pierwiastków C/N, C/P, C/Fe czy C/Mg wpływa na produkcję biosurfaktantów. W niektórych przypadkach duże znaczenie ma ograniczenie zawartości azotu w podłożu hodowlanym, które prowadzi do nadprodukcji biosurfaktantów [31]. Zdaniem wielu autorów przy stosunku C/N wynoszącym 16/1 lub 18/1 występuje maksymalna produkcja ramnolipidów [19]. Niemniej ważne są czynniki środowiskowe warunkujące wzrost mikroorganizmów, takie jak pH, temperatura czy dostępność tlenu. Stąd też optymalizacja produkcji poszczególnych biosurfaktantów jest niezwykle ważnym zagadnieniem mającym wpływ na wydajność i koszty ich produkcji. Zmniejszenie kosztów produkcji biosurfaktantów możliwe jest także dzięki zastosowaniu komórek immobilizowanych oraz wprowadzeniu do hodowli prekursorów biosurfaktantów [9,11].

Ostatni, niezwykle ważny, etap produkcji stanowi separacja biosurfaktantów z podłoża hodowlanego. Etap ten może pochłaniać ponad połowę kosztów produkcji. Dobór metody separacji biosurfaktantów zależy od ich ładunku jonowego, rozpuszczalności w wodzie oraz umiejscowienia (wewnętrzne, zewnętrzne lub związane z komórką). Najczęściej stosowane techniki izolacji biosurfaktantów to wytrącanie kwasem, siarczanem amonu lub acetonem, ekstrakcja z użyciem heksanu, butanolu, pentanu, octanu etylu czy mieszaniny rozpuszczalników dichlorometan-metanol i chloroform-metanol, a także krystalizacja [32–34]. Techniki te stosowane są zwykle w różnych kombinacjach. Obok metod konwencjonalnych, warto zwrócić uwagę na nowsze, stosowane do izolowania biosurfaktantów w procesach ciągłych, takie jak wirowanie, adsorpcja na żywicach polistyrenowych czy węgla aktywnym, diafiltracja i wytrącanie, ultrafiltracja, frakcjonowanie piany i wytrącanie oraz chromatografia jonowymieniana [9,35]. Metoda filtracji membranowej została z powodzeniem zastosowana w pracy [15] do izolacji i oczyszczania ramnolipidu z hodowli *Pseudomonas aeruginosa* BI.

Zastosowanie biosurfaktantów w inżynierii środowiska

Właściwości fizyczno-chemiczne i biologiczne biosurfaktantów sprawiają, że mogą być one wykorzystywane w technologiach oczyszczania wód i gruntów. Decyduje o tym ich duża specyficzność działania, przy stosunkowo niskiej toksyczności i wyższa niż surfaktantów syntetycznych podatność na biodegradację. Biosurfaktanty mają nie tylko zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego i międzyfazowego, ale także umożliwiają tworzenie oraz destabilizację emulsji, solubilizację związków hydrofobowych w roztworach wodnych oraz tworzenie pian i żeli. Zastosowanie biosurfaktantów w inżynierii środowiska związane jest głównie ze stymulacją procesu biodegradacji hydrofobowych zanieczyszczeń organicznych oraz eliminacją metali śladowych ze środowiska gruntowo-wodnego [36].

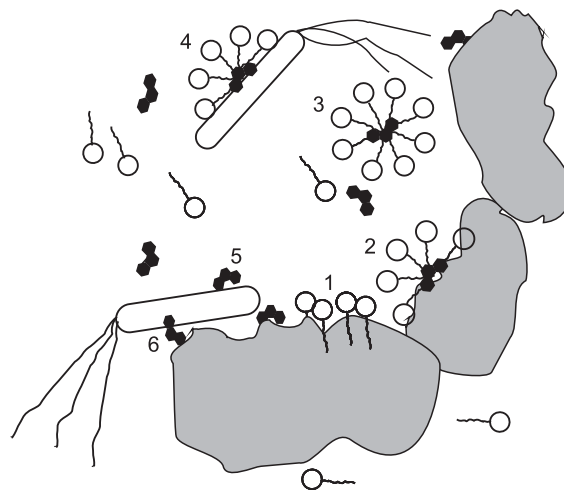
Bioremediacja gruntów

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego hydrofobowymi związkami organicznymi stanowi poważne zagrożenie. Do najczęściej występujących tego typu skażeń należą ropa naftowa i produkty naftowe stanowiące mieszaninę węglowodorów o zróżnicowanych właściwościach fizyczno-chemicznych i biologicznych. Niektóre z węglowodorów charakteryzują się znaczną toksycznością oraz właściwościami mutagennymi i rakotwórczymi [36]. Do ich eliminacji ze środowiska gruntowo-wodnego wykorzystywane są metody fizyczno-chemiczne oraz biologiczne, których zadaniem jest desorpcja węglowodorów z matrycy glebowej, a następnie ich degradacja. Stosowanie technologii oczyszczania opartych na procesach fizyczno-chemicznych wiąże się z niebezpieczeństwem ich negatywnego wpływu na strukturę gleby oraz zasiedlające ją organizmy żywe. Z tego względu za najbardziej przyjazne środowisku uważane są metody biologiczne. Wykorzystanie zdolności degradacyjnych mikroorganizmów pozwala na opracowanie technologii charakteryzujących się nie tylko dużą skutecznością, ale również przyjaznych środowisku. W porównaniu z innymi metodami oczyszczania gruntów remediacja prowadzona metodami biologicznymi okazała się mniej kosztowna i dająca możliwość szybkiego przywrócenia równowagi ekologicznej na terenach zanieczyszczonych. O szybkości przebiegu procesów biologicznego rozkładu zanieczyszczeń organicznych decydują takie parametry, jak [36]:

- liczebność i aktywność degradacyjna drobnoustrojów,
- struktura chemiczna węglowodorów i ich toksyczność w stosunku do mikroflory,
- biodostępność węglowodorów wynikająca z ich rozpuszczalności oraz procesów adsorpcji węglowodorów w glebie,
- obecność odpowiedniego akceptora elektronów,
- sprzyjające warunki środowiskowe, jak temperatura, światło, pH, tlen, wilgotność, potencjał redoks,
- zawartość związków biogennych, tj. azotu i fosforu i ich relacje w stosunku do siebie i węgla pierwiastkowego wchodzącego w skład węglowodorów lub innych związków organicznych obecnych w glebie,
- zawartość węglowodorów; mała ilość substratu może ograniczać biodegradację,
- obecność innych źródeł węgla niż węglowodory,
- obecność innych związków toksycznych i inhibujących proces.

W procesach biologicznego oczyszczania wód i gruntów skażonych węglowodorami główną rolę odgrywają mikroorganizmy zdolne do ich wykorzystania w charakterze substratu pokarmowego. Uzyskane efekty oczyszczania zależą od aktywności metabolicznej mikroorganizmów, ale także od właściwości fizycznych i chemicznych zanieczyszczeń oraz warunków środowiskowych, w jakich odbywa się proces biodegradacji [36, 37]. Czynnikiem hamującym ten proces jest słaba rozpuszczalność w wodzie większości węglowodorów oraz tendencja do ich adsorpcji na matrycy glebowej. Rozpuszczalne w wodzie, a więc bioprzyswajalne, są tylko węglowodory krótkołańcuchowe, natomiast pobieranie przez mikroorganizmy pozostałych hydrofobowych związków możliwe jest dzięki specjalnym mechanizmom umożliwiającym ich transport przez błonę cytoplazmatyczną. Uważa się, że do najważniejszych z nich należy zdolność mikroorganizmów do wytwarzania biosurfaktantów [13, 38]. Mikroorganizmy wykształciły

kilka podstawowych mechanizmów, dzięki którym są zdolne do wykorzystywania w charakterze substratu pokarmowego węglowodorów naftowych obecnych w środowisku gruntowo-wodnym (rys. 2) [15, 21, 36, 39]. Jeden z nich pozwala na biodegradację jedynie węglowodorów rozpuszczalnych w wodzie, zdolnych do przenikania przez błonę cytoplazmatyczną. Postęp biodegradacji tych związków zależy od szybkości ich przechodzenia do fazy rozpuszczonej. Rolą biosurfaktantu jest tu zwiększenie transportu węglowodoru do fazy wodnej.

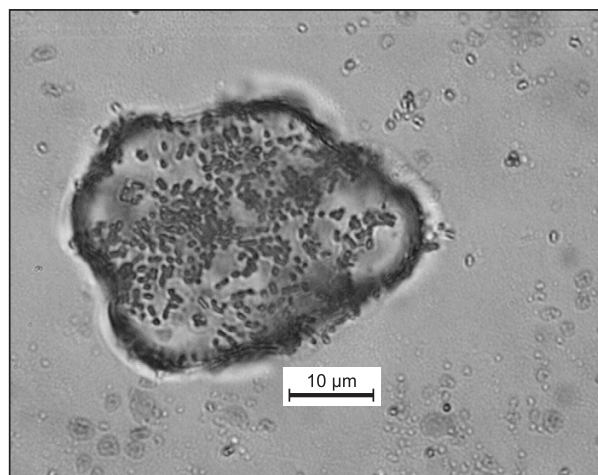


- 1 – Adsorpcja surfaktantu na matrycy glebowej
- 2, 3 – Uruchamianie substratu przez micelle
- 4 – Adsorpcja miceli przez bakterie i pobór substratu
- 5 – Bezpośredni pobór substratu z fazy wodnej
- 6 – Bezpośredni pobór substratu z fazy stałej

Rys. 2. Pobieranie przez mikroorganizmy hydrofobowego substratu zawartego w micelach [15, 21, 36, 39]

Fig. 2. Hydrophobic substrate uptake by microorganisms from micelles [15, 21, 36, 39]

Istnieją mechanizmy umożliwiające drobnoustrojom rozkład węglowodorów zawieszonych w postaci drobnych kropli w roztworach wodnych. Krople większe od komórek rozkładane są przez bezpośredni kontakt komórek bakterii z zawieszonymi w wodzie cząstkami niepolarnych związków organicznych (rys. 3). Na ich powierzchni rozwija się populacja mikroorganizmów i w miejscu bezpośredniego kontaktu dochodzi do przechodzenia węglowodorów przez



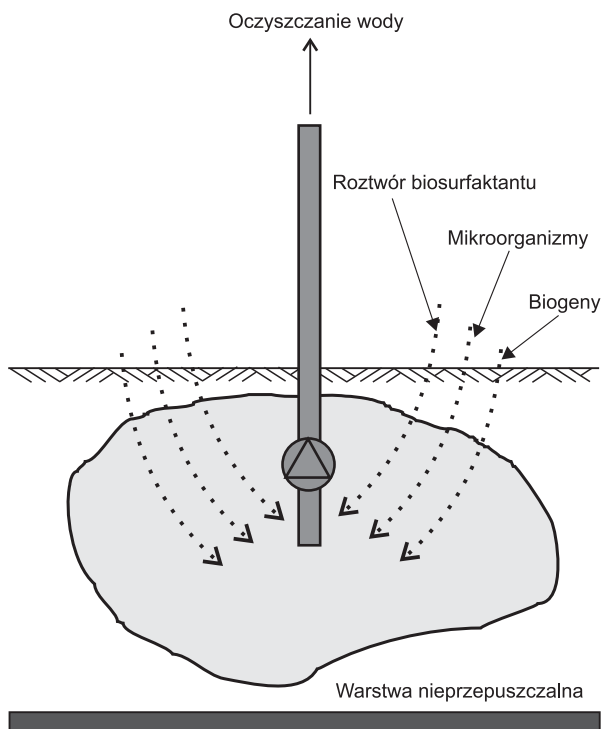
Rys. 3. Zasiedlanie kropli oleju napędowego przez mikroorganizmy [27]

Fig. 3. Diesel oil droplet colonization by microorganisms [27]

blonę cytoplazmatyczną. Główną rolę w tym procesie odgrywa hydrofobowość powierzchni komórek mikroorganizmów i wytwarzanie biosurfaktantów związanych ze ścianą komórkową mikroorganizmów [40–44]. Utylizacja kropelek mniejszych od komórek mikroorganizmów możliwa jest dzięki procesowi pseudosolubilizacji. Wytwarzane przez mikroorganizmy metabolity zewnątrzkomórkowe o charakterze surfaktantów lub emulgatorów powodują przejście substratu do kropelek o rozmiarach mniejszych niż 1 μm i w takiej postaci są one prawdopodobnie przeprowadzane przez błonę cytoplazmatyczną. Węglowodory pobierane są z rdzeni miceli przez ich połączenie z błoną komórkową (rys. 2).

Zdolność do wytwarzania biosurfaktantów mają jednak tylko nieliczne mikroorganizmy. Zdaniem wielu badaczy bioprzyswajalność węglowodorów przez konsorcja mikroorganizmów zasiedlających środowisko gruntowo-wodne można zwiększyć wprowadzając surfaktanty syntetyczne bądź biosurfaktanty [1, 22, 30, 35]. Proces bioremediacji wspomaganiej surfaktantem może odbywać się bezpośrednio w gruncie w warunkach *in situ* (rys. 4) oraz *ex situ*, po jego wydobyciu i umieszczeniu na specjalnie uformowanej i odizolowanej od podłoża przymie (rys. 5) [36].

Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nie są jednak jednoznaczne. Odnotowano zarówno wzrost, jak i hamowanie procesów degradacyjnych w wyniku wprowadzenia surfaktantów [45]. Skuteczność tego zabiegu jest uwarunkowana licznymi czynnikami natury biologicznej i fizyczno-chemicznej [36]. Decyduje o niej typ surfaktantu oraz ilość i rodzaj zanieczyszczenia, a także toksyczność. Ważna jest także zdolność do adsorpcji na matrycy glebowej zarówno substancji stanowiącej zanieczyszczenie, jak i biosurfaktantu. Wpływ na przebieg procesu biodegradacji ma ponadto skład chemiczny oraz inne czynniki środowiskowe, takie jak, pH czy temperatura.



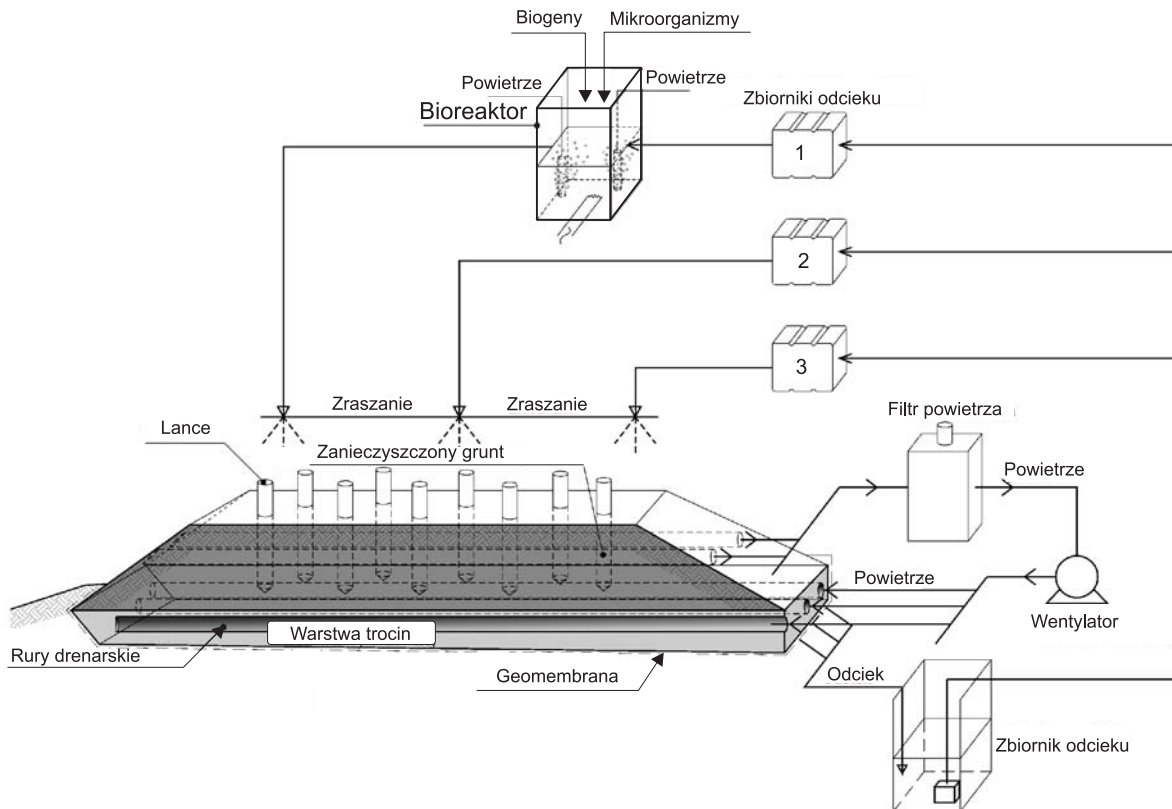
Rys. 4. Schemat bioremediacji gruntu *in situ* wspomaganiej biosurfaktantem

Fig. 4. Scheme of biosurfactant-stimulated soil bioremediation *in situ*

Wśród czynników biologicznych warto zwrócić uwagę na skład ilościowy i jakościowy mikroflory autochtonicznej. Znaczenie ma nie tylko zdolność tej mikroflory do wytwarzania związków powierzchniowo czynnych i wykorzystywania węglowodorów w charakterze substratu pokarmowego. Nie bez znaczenia jest także możliwość wykorzystywania przez mikroorganizmy wprowadzonego z zewnątrz surfaktantu w charakterze substratu pokarmowego. Jeśli mikroorganizmy chętniej biodegradowują surfaktanty niż substancję stanowiącą zanieczyszczenie, to skuteczność działania środka powierzchniowo czynnego maleje. Co ważniejsze, w tym przypadku środek powierzchniowo czynny może powodować represję transkrypcji/translacji enzymów wymaganych do katabolizowania zanieczyszczeń, a także sprzyjać rozwojowi populacji bakterii, które nie degradują danego zanieczyszczenia.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się ocenie zależności między hydrofobowością komórek mikroorganizmów a skutecznością prowadzonego przez nie procesu biodegradacji [40–45]. Hydrofobowość komórek podlega zmianom w czasie hodowli i zależy od składu chemicznego podłoża hodowlanego, rodzaju wykorzystywanego źródła węgla, a także od obecności surfaktantu. Początkowa wysoka hydrofobowość komórek mikroorganizmów pozwala na bezpośrednią reakcję między powierzchnią komórek a źródłem węgla, co umożliwia szybszą utylizację węglowodorów. Badania wykazały, że szczepy o właściwościach hydrofilowych mogą także skutecznie rozkładać węglowodory. Modyfikacja właściwości powierzchniowych następuje u nich dopiero po kontakcie z hydrofobowym źródłem węgla. W ich przypadku wprowadzany surfaktant może wpływać na zmianę hydrofobowości komórek mikroorganizmów. Jego adsorpcja na powierzchni komórek pozwala na pokonanie ograniczeń związanych z transportem hydrofobowego substratu do wnętrza komórki [40]. Wykazano, że ramnolipidy wprowadzone do hodowli drożdży *Candida maltosa* nie są przez nie metabolizowane, lecz gromadzone są na ich powierzchni. Ilość zaadsorbowanych biosurfaktantów zależy od wieku hodowli drożdży i zwiększa się wraz z jej wiekiem. Obecność ramnolipidów na powierzchni komórek drożdży stymuluje prowadzony przez nie proces biodegradacji węglowodorów [41, 42]. Badania wykazały, że oddziaływanie między mikroorganizmami degradującymi węglowodory, surfaktantami i hydrofobowymi substratami są bardzo różnicowane oraz uzależnione od wielu czynników i nie są do tej pory w pełni wyjaśnione [43, 44]. Wprowadzenie surfaktantu do hodowli komórek o powierzchni hydrofobowej może mieć negatywny wpływ na proces biodegradacji, gdyż zakłóca interakcje między substancją stanowiącą zanieczyszczenie a komórką mikroorganizmu. W pracy [45] zaobserwowano, że Triton X-100 w małych ilościach (0,09 CMC) inhibitował szybkość wzrostu *Mycobacterium* sp. i *Pseudomonas* sp. na stałym antracenie, natomiast podczas wzrostu na glukozie nie obserwowano zahamowania wzrostu mikroorganizmów przez ten surfaktant, ponieważ adsorpcja surfaktantu jednocześnie na powierzchni komórek i na cząsteczkach antracenu mogła inhibitować wykorzystanie antracenu.

Skuteczność stymulacji procesu biodegradacji za pomocą surfaktantu zależy od rodzaju zastosowanego syntetycznego związku powierzchniowo czynnego lub biosurfaktantu oraz jego ilości. Do najważniejszych cech decydujących o ich przydatności należy budowa chemiczna i związana z nią podatność surfaktantu na biodegradację. Surfaktant z jednej strony powinien być podatny na proces biodegradacji,



Rys. 5. Schemat bioremediacji *ex situ* wspomaganej biosurfaktantem (1 – zasilanie bioreaktora, 2 – roztwór biogenów, 3 – roztwór biosurfaktantu) [36]
 Fig. 5. Flow diagram of biosurfactant-stimulated bioremediation process *ex situ* (1 – bioreactor inflow, 2 – biogen solution, 3 – biosurfactant solution) [36]

gdyż po jego zakończeniu nie może stanowić zanieczyszczenia zagrażającego środowisku. Z drugiej jednak strony jego obecność warunkuje utrzymanie węglowodoru w stanie rozproszenia, a więc zbyt szybki rozkład surfaktantu będzie ograniczał stymulację procesu biodegradacji.

Przeprowadzona w ramach badań własnych [47] selekcja surfaktantów syntetycznych dostępnych na polskim rynku wykazała, że większość z nich stymuluje proces biodegradacji węglowodorów modelowych oraz ich mieszanin wchodzących w skład ropy naftowej i produktów naftowych [46]. Uzyskane efekty stymulacji uzależnione były od rodzaju wprowadzonego surfaktantu. Najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku oleju napędowego biodegradowanego w obecności Rokafenolu N-8 i N-9 (HLB=13). Oznaczało to, że stymulacja biodegradacji zależała w dużej mierze od liczby grup etoksylowych w łańcuchu oraz wartości HLB charakteryzującej dany surfaktant. Zdolność do stymulacji procesu biodegradacji wynikała prawdopodobnie także z obecności pierścienia aromatycznego w cząsteczce surfaktantu, który opóźniał tempo biodegradacji danego surfaktantu. Dzięki temu tempo biodegradacji węglowodorów i surfaktantu mogło być w tym przypadku zbliżone i zapewnić utrzymanie węglowodorów w stanie rozproszenia przez dłuższy czas niż w przypadku pozostałych surfaktantów [47].

Optymalna ilość surfaktantu w procesie biodegradacji jest różna w odniesieniu do poszczególnych typów surfaktantów. W przypadku Rokafenolu N9 najlepsze rezultaty uzyskano w hodowlach zawierających surfaktant w ilości $0,5 \text{ g/dm}^3$. Wprowadzenie większych ilości surfaktantu nie spowodowało zwiększenia skuteczności procesu. Wykazano ponadto zależność poziomu stymulacji biodegradacji Rokafenolem N9 od rodzaju produktu naftowego [48].

Skład wykorzystanych w doświadczeniach [49] frakcji ropy naftowej różnił się zawartością składników o niskiej podatności na biodegradację. Najwięcej związków podatnych na rozkład mikrobiologiczny obecnych było w lekkim oleju napędowym, natomiast mazut złożony był głównie z trudno rozkładalnych węglowodorów izoprenoidowych oraz wielopierścieniowych węglowodorów naftenowych i aromatycznych. Najlepsze rezultaty uzyskano stosując surfaktanty do stymulacji biodegradacji frakcji zawierających większe ilości składników trudnodostępnych i słabo biodegradowalnych (ciężki olej napędowy, mazut). Najniższy poziom stymulacji osiągnięto w próbach z lekkim olejem napędowym [49].

Wpływ surfaktantu na rozkład mikrobiologiczny poszczególnych składników w złożonych mieszaninach nie jest identyczny, a ich biodegradacja nie zachodzi z tą samą skutecznością. Analiza składu jakościowego węglowodorów zawartych w ropie naftowej (Radoszyn-1) wykazała, że proces biodegradacji przebiegający w obecności surfaktantu syntetycznego (Tween 80) miał charakter sekwencyjny [50]. Stwierdzona podatność węglowodorów na biodegradację malała następująco: n-alkany > n-alkilocykloheksany + n-alkilobenzeny > izoalkany + izoalkilobenzeny > rdzeniowe węglowodory aromatyczne + rdzeniowe węglowodory aromatyczne zawierające siarkę > rdzeniowe węglowodory aromatyczne podstawione grupami metylowymi > wielopierścieniowe węglowodory alicykliczne (dwucykliczne seskwiterpeny i pięciocykliczne triterpeny). W obrębie danej grupy związków biodegradacja była bardziej skuteczna w przypadku składników niżej cząsteczkowych oraz polimetylopo pochodnych węglowodorów aromatycznych zawierających mniejszą liczbę pierścieni aromatycznych i podstawników metylowych [50].

Badania wykonane w ostatnich latach wskazują na możliwość wprowadzenia biosurfaktantów w miejsce surfaktantów syntetycznych w technologiach oczyszczania wód i gruntów. Efektem ich działania, podobnie jak surfaktantów syntetycznych, jest wzrost rozpuszczalności węglowodorów wchodzących w skład benzyn i oleju napędowego, co umożliwia ich wykorzystanie przez mikroorganizmy w charakterze substratu pokarmowego [51, 52]. Wyniki badań dowodzą, że ramnolipidy stymulują biodegradację nie tylko pojedynczych węglowodorów, ale także ich mieszanin, takich jak olej napędowy czy smoła pogazowa [47, 53–56]. Obok ramnolipidów zdolność do stymulacji procesu biodegradacji pojedynczych węglowodorów oraz ich mieszanin mają m.in. biosurfaktanty, takie jak trehalozolipidy, soforolipidy czy celobiozolipidy, które stymulują biodegradację zarówno węglowodorów parafinowych, jak i aromatycznych [57, 58]. Wprowadzenie soforolipidów pozwoliło na podwojenie szybkości degradacji mieszaniny węglowodorów złożonej z tetradekanu, pentadekanu, heksadekanu, pristanu i naftalenu [59]. Zdaniem niektórych autorów dodatek glikolipidów do podłoża stymuluje także biodegradację węglowodorów chlorowanych, a nawet polichlorowanych bifenyli [60]. Obok biosurfaktantów małowcząsteczkowych do wspomagania biodegradacji węglowodorów mogą być wykorzystywane biosurfaktanty polimerowe, takie jak tzw. bioemulsjony produkowane przez szczepy z rodzaju *Gordonia*. Zaobserwowano, że przyspieszają one biodegradację pristanu i obniżają znacząco jego zawartość w zanieczyszczonej glebie [61]. Stymulacja procesu biodegradacji mieszanin przez biosurfaktanty w wielu przypadkach ma charakter selektywny i dotyczy tylko niektórych węglowodorów. W obecności ramnolipidów z *Pseudomonas aeruginosa* AT10 obserwowano wyraźny wzrost skuteczności biodegradacji jedynie izoprenoidów z frakcji alifatycznej, a z frakcji aromatycznej alkilowanych WWA, natomiast surfaktyna z *Bacillus subtilis* wspomagała biodegradację jedynie węglowodorów alifatycznych [53]. Biosurfaktanty charakteryzują się większą skutecznością działania w stosunku do tego typu zanieczyszczeń, w porównaniu do surfaktantów syntetycznych [62, 63]. Skuteczność działania biosurfaktantów pochodzenia mikrobiologicznego okazała się wyższa nie tylko w porównaniu do surfaktantów syntetycznych, ale także saponin – związków powierzchniowo czynnych pochodzenia roślinnego. Ramnolipidy w ilości 120 g/m³ zwiększyły biodegradację oleju napędowego przez *Pseudomonas stutzeri* z 54% w hodowli kontrolnej do 88% po 14 dobach hodowli [40].

W badaniach własnych potwierdzono wyraźną stymulację biodegradacji oleju napędowego wynikającą z wprowadzenia do hodowli ramnolipidów pochodzących ze szczepu *Pseudomonas* P-17 [56]. Ich obecność spowodowała wzrost skuteczności biodegradacji średniego oleju napędowego z 35% w próbkach kontrolnych do 85% w próbce z tym surfaktantem w ilości 500 g/m³. Analiza jakościowa pozostałości po biodegradacji metodą GC-MS wykazała, że w hodowli kontrolnej bez surfaktantu rozkładowi uległy przede wszystkim węglowodory małowcząsteczkowe (C₉–C₁₃). Stwierdzono względny wzrost zawartości węglowodorów izoparafinowych w porównaniu do węglowodorów n-parafinowych. W próbkach po procesie biodegradacji w obecności biosurfaktantu głównymi składnikami były węglowodory izoparafinowe oraz wielkowcząsteczkowe n-alkany (C₂₀–C₂₉). Określono także wpływ biosurfaktantów na stymulację biodegradacji smoły pogazowej. Substancja ta pod względem chemicznym stanowi mieszaninę

węglowodorów aromatycznych, parafinowo-naftenowych i związków polarnych (żywice). Odpad ten powstaje podczas uzyskiwania gazu w procesie suchej destylacji węgla. Związki wchodzące w jej skład charakteryzują się wysoką toksycznością, zdolnością do bioakumulacji oraz niską podatnością na rozkład mikrobiologiczny. Mimo że do biodegradacji użyto szczepów degradujących węglowodory, bez dodatku surfaktantu nie uzyskano rezultatów świadczących o biologicznym rozkładzie smoły. Dopiero wprowadzenie ramnolipidu pochodzącego ze szczepu *Pseudomonas* P-17 spowodowało inicjację procesu biodegradacji, jednakże ubytek substratu w obecności małej ilości ramnolipidu nie był znaczący. Potwierdzenie stymulacji procesu biodegradacji uzyskano dopiero po wprowadzeniu do hodowli ramnolipidu w dawce 125 g/m³. Ubytek smoły pogazowej wynosił w tym przypadku 27,7% po 14 dobach inkubacji. Analiza składu grupowego wykazała, że udział węglowodorów, zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych, w produktach biodegradacji w obecności optymalnej ilości biosurfaktantu był mniejszy niż w wyjściowej próbce smoły. Analiza wydajności ekstrakcji smoły z hodowli przed wprowadzeniem bakterii wykazała, że obecność surfaktantu miała istotny wpływ na masę ekstrahowanej smoły, dlatego też wszystkie analizy ilościowe powinny uwzględniać kontrolę prowadzoną w przypadku każdej ilości wprowadzonego surfaktantu bez dodatku bakterii [56].

Zawartość surfaktantu jest jednym z ważniejszych czynników decydujących o wzroście bioprzyzwajalności węglowodorów w jego obecności [64]. Uważa się, że jedynie ilości powyżej wartości CMC pozwalają na wytworzenie miceli i pseudosolubilizację węglowodorów. Potwierdzają to badania [65], w których wykazano, że surfaktanty Brij 30 i Triton X-100 w ilościach powyżej CMC nie były toksyczne dla bakterii rozkładających naftalen, a obecność miceli surfaktantów nie hamowała procesu mineralizacji naftalenu. Naftalen rozpuszczony w micelach w podłożu płynnym był przyzwajalny i degradowany przez mieszaną kulturę bakterii. W innych badaniach dodatek ramnolipidu w ilości powyżej CMC wyraźnie stymulował rozpuszczalność i biodegradację heksadekanu, oktadekanu, n-parafin, kreozotów i innych węglowodorów w glebie oraz promował biodegradację ropy naftowej w ściekach [66–69]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku ramnolipidu wyizolowanego ze szczepu *Pseudomonas aeruginosa* BI [15]. Skuteczność biodegradacji pozostałości po destylacji ropy naftowej rosła wraz ze wzrostem ilości tego ramnolipidu (CMC=40 g/m³), ale tylko do zawartości 80 g/m³ (2 CMC), przy którym ubytek substratu był największy. Powyżej tej ilości zaobserwowano zmniejszenie stopnia biodegradacji [15]. W pracy [70] stwierdzono, że wartości CMC wyznaczone w przypadku roztworów wodnych surfaktantów były znacząco niższe od wartości wyznaczonych w układach naturalnych – np. w systemach biologicznych wartość CMC w przypadku saponin i Tritonu X była dwukrotnie większa, a ramnolipidów trzykrotnie większa niż w roztworach wodnych. Dlatego też konieczne jest eksperymentalne wyznaczenie wartości CMC w poszczególnych układach, aby zapewnić stymulację procesu biodegradacji przez surfaktant. Zjawisko to ma duże znaczenie w technologiach oczyszczania wód i gruntów z hydrofobowych związków organicznych.

Należy jednak pamiętać, że zbyt duże ilości surfaktantów mogą hamować proces biodegradacji ze względu na toksyczne działanie tych związków na strukturę błony

komórkowej mikroorganizmów [71]. Niektóre z surfaktantów syntetycznych charakteryzują się wysoką toksycznością w stosunku do organizmów zasiedlających środowisko gruntowo-wodne, w tym także do drobnoustrojów biorących udział w procesie biodegradacji. Do najbardziej toksycznych zalicza się kationowe substancje powierzchniowo czynne, natomiast surfaktanty niejonowe i anionowe zaliczane są do IV i V klasy toksyczności. Oddziaływanie tych substancji na organizmy żywe jest uzależnione od ich budowy chemicznej [72]. Duże znaczenie mają także czynniki środowiskowe, takie jak twardość wody, temperatura, pH oraz interakcje wynikające z obecności innych związków chemicznych w środowisku. Bardziej przyjazne środowisku okazały się biosurfaktanty z uwagi na ich niską toksyczność i biodegradowalność. Z tego też względu są one także związkami bardziej preferowanymi w technologiach oczyszczania wód i gruntów. Poszczególne biosurfaktanty wykazują zróżnicowaną toksyczność w stosunku do komórek bakterii testowych *Vibrio fischeri*. Ilość substancji hamująca luminescencję bakterii testowych o 50% (EC_{50}), w przypadku ramnolipidu Rha-Rha-C10-C10 wyizolowanego z hodowli *Pseudomonas aeruginosa* BI, wynosiła 20 g/m^3 . Wykazuje on nieco mniejszą toksyczność niż ramnolipid produkowany przez *Pseudomonas* sp. PS-17, którego EC_{50} wynosiło 13 g/m^3 [15]. Ramnolipid Rha-Rha-C10-C10 okazał się 5-krotnie mniej cytotoksyczny w stosunku do komórek linii A_{549} , w porównaniu z ramnolipidem produkowanym przez *Pseudomonas* sp. PS-17, którego zawartość powodująca degenerację komórek po 72 godzinach kontaktu wynosiła $6,25 \text{ g/m}^3$ [7, 73].

Hamowanie procesu biodegradacji może wynikać także ze wzrostu toksyczności samych zanieczyszczeń. Zbyt duża ilość biosurfaktantu może zwiększyć solubilizację węglowodorów do takiego stopnia, w którym będą one toksycznie oddziaływać na mikroorganizmy. Wzrost toksyczności węglowodorów może następować zarówno w obecności surfaktantów syntetycznych, jak i biosurfaktantów. Testy toksykologiczne wykazały, że obecność surfaktantu może zwiększać nawet 100-krotnie toksyczność fenantrenu [74]. Z drugiej strony dodatek niektórych surfaktantów lub pseudosolubilizowanych zanieczyszczeń może działać selektywnie i wykazywać toksyczność w stosunku do czystych kultur, ale może nie mieć wpływu na przebieg procesu bioremediacji z wykorzystaniem konsorcjum mikroorganizmów. Wynika to prawdopodobnie z różnej wrażliwości poszczególnych mikroorganizmów wchodzących w skład konsorcjum. Okazało się także, że biosurfaktanty mogą pełnić zupełnie inną rolę niż dotychczas przypuszczano. W niektórych przypadkach dodatek biosurfaktantów może być przyczyną zmniejszenia toksyczności ksenobiotyków. Zamknięcie chlorofenoli w hydrofobowym rdzeniu miceli nie tylko zmniejsza ich toksyczność względem komórek *Pseudomonas putida* 2A, ale także czyni je mniej dostępnymi dla mikroorganizmów [24].

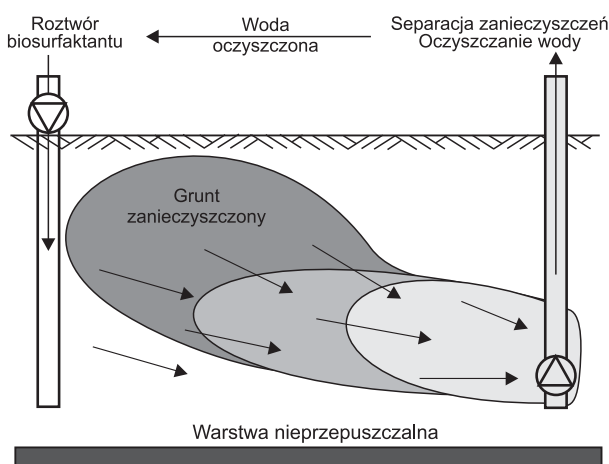
Poważnym ograniczeniem procesu bioremediacji jest adsorpcja zanieczyszczeń. Substancje organiczne podlegają adsorpcji na powierzchni frakcji mineralnej i organicznej szkieletu gruntowego, co powoduje ich unieruchomienie, opóźnienie migracji, a także sprawia, że stają się niedostępne dla mikroorganizmów. Na wydajność adsorpcji mają wpływ zarówno właściwości gruntu, jak i zanieczyszczeń, a także czynniki środowiskowe [75]. Adsorpcji podlegają między innymi węglowodory aromatyczne, w tym WWA, niebezpieczne ze względu na dużą toksyczność, a także właściwości mutagenne i rakotwórcze. Na

wzrost dostępności węglowodorów mają wpływ procesy fizyczno-chemiczne zachodzące z udziałem surfaktantów. Obniżenie napięcia międzyfazowego i powierzchniowego między zanieczyszczeniem a gruntem powoduje zwiększenie migracji zanieczyszczeń uwięzionych w porach gruntu. Osiągnięcie wartości poniżej $0,1 \text{ mN/m}$ prowadzi do tworzenia mikroemulsji i rozproszenia zanieczyszczeń hydrofobowych. Dalszy wzrost zawartości surfaktantu do wartości powyżej CMC sprawia, że w roztworach wodnych powstają micelle umożliwiające pseudosolubilizację zanieczyszczeń [25].

Biosurfaktanty (ramnolipidy) wpływają na wzrost rozpuszczalności fenantrenu oraz promują wzrost mikroorganizmów i biodegradację tego węglowodoru [76]. Podobne efekty daje zastosowanie Alasanu produkowanego przez *Acinetobacter radioresistens* [77] oraz soforolipidów produkowanych przez *Candida bombicola* [78]. Skuteczność biodegradacji tego węglowodoru zależy jednak od adsorpcji samego biosurfaktantu przez matrycę glebową [79]. O adsorpcji ramnolipidu decyduje typ gleby, od którego zależy jego zawartość w fazie wodnej dostępnej w procesie biodegradacji. Gleby zawierające mało glinokrzemianów i tlenków żelaza wykazują niewielką adsorpcję ramnolipidów, podczas gdy duża zawartość żelaza nie jest wskazana w procesie bioremediacji prowadzonym z wykorzystaniem ramnolipidów [80]. Skuteczność działania biosurfaktantów uzależniona jest także od takich czynników środowiskowych, jak pH, temperatura czy zasolenie. Wykazano, że ramnolipidy wspomagają dyspersję i biodegradację okta-dekanu, jednakże była ona większa w warunkach wyższego pH [81]. Zmiana pH z 5,5 do 8,0 ma bowiem wpływ na strukturę ramnolipidu, który w tych warunkach zmienia postać lamelarną na pęcherzykową i micelarną [82, 83]. Okazało się także, że temperatura może zwiększać skuteczność działania biosurfaktantów przez stymulację procesu solubilizacji. Usuwanie heksadekanu za pomocą biosurfaktantów było wydajniejsze w temperaturze 60°C niż w temperaturze 18°C [84]. Wpływ biosurfaktantów na przebieg procesu biodegradacji węglowodorów parafinowych zależy także od obecności niektórych kationów. Wzrostowi stężenia kationów wapnia i magnezu oraz obniżeniu pH towarzyszyło zmniejszenie napięcia międzyfazowego, co wspomagało solubilizację [85].

Usuwanie zanieczyszczeń węglowodorowych z gruntu metodą przemywania

Trudno biodegradowalne zanieczyszczenia organiczne zalegające przez wiele lat w gruncie ulegają starzeniu i stanowią poważny problem ekologiczny. Spośród dotychczas opracowanych metod ich eliminacji za najbardziej skuteczne uznaje się metody przemywania (soil flushing). Polegają one na wprowadzeniu do gruntu roztworów płuczających umożliwiających oddzielenie zanieczyszczeń od ziaren gruntu. Proces odbywa się w warunkach *in situ* i polega na wymuszeniu pionowego, a następnie poziomego przepływu wody wraz z uwolnionymi zanieczyszczeniami w środowisku gruntowo-wodnym. Woda po wypompowaniu na powierzchnię podlega oczyszczeniu metodami fizyczno-chemicznymi bądź biologicznymi i jest zwracana do warstwy wodonośnej środowiska gruntowego (rys. 6). Chemiczne środki powierzchniowo czynne od dawna są stosowane w procesach przemywania gleby roztworami wodnymi. Obok surfaktantów w tym procesie wykorzystywane są również kosurfaktanty, kosolwenty i elektrolity. Usuwanie węglowodorów na drodze przemywania opiera się

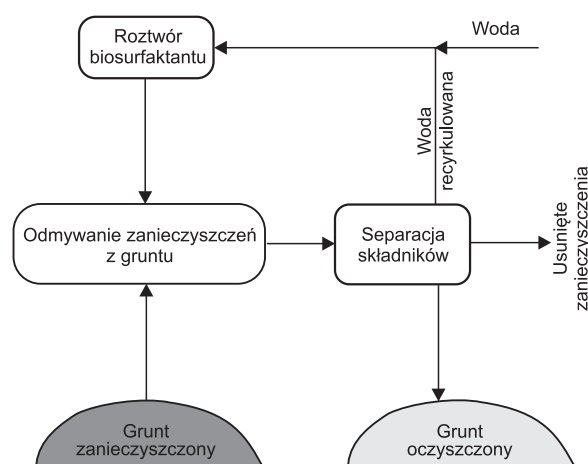


Rys. 6. Schemat procesu przemywania gruntu
Fig. 6. Scheme of soil flushing process

na mechanizmach uruchamiania i rozpuszczania. Na przebieg procesu przemywania ma wpływ temperatura roztworu, rodzaj i wiek danego zanieczyszczenia oraz struktura geologiczna gruntu. Nie bez znaczenia jest także rodzaj i ilość surfaktantu oraz innych wymaganych reagentów. Heterogeniczność gruntu oraz adsorpcja związku powierzchniowo czynnego na cząstkach gruntu obniża skuteczność procesu [25, 86–88].

Obok surfaktantów syntetycznych w procesie przemywania gruntu z powodzeniem stosowane są także biosurfaktanty. Są one przydatne w procesach wypierania z gruntu fazy gęstych niewodnych cieczy (DNAPL – dense non-aqueous phase liquid) przez obniżenie napięcia międzyfazowego między nimi a wodami gruntowymi [89, 90]. Ramnolipidy były przydatne w procesie usuwania oleju z piasku nadmorskiego [91]. Okazały się one także skuteczne w usuwaniu WWA [92, 93] i pentachlorofenolu z gleby [94]. Wydajność tych procesów zależała od czasu kontaktu i ilości biosurfaktantu, ale zwykle mieściła się w granicach 60÷80% [95, 96]. Biosurfaktanty zwiększały pozorną rozpuszczalność WWA nawet 5-krotnie w porównaniu do surfaktantów syntetycznych [97, 98]. W badaniach [99] do przemywania gruntu zanieczyszczonego ropą naftową wykorzystano roztwory eskuliny, lecytyny, ramnolipidu, saponin i tannin. Skuteczność procesu prowadzonego za pomocą roztworu ramnolipidów była wysoka i wynosiła 80%. W innych badaniach [61] ramnolipidy usuwały 74% fenantrenu, 45% antracenu i 69% pirenu ze sztucznie skażonej gleby, natomiast bioemulsany BS29 produkowane przez *Gordonia* usuwały 32% fenantrenu, 19% antracenu i 26% pirenu. Biosurfaktanty produkowane przez *Rhodococcus ruber* okazały się bardziej skuteczne niż surfaktanty syntetyczne, takie jak Tween 80 [100].

W przypadku skażenia gruntu wysoko toksycznymi i niebezpiecznymi substancjami oddzielanie zanieczyszczenia od gruntu odbywa się w warunkach *ex situ* i określane jest jako odmywanie (soil washing) (rys. 7). Proces oczyszczania prowadzony jest w specjalnych reaktorach lub w odizolowanych od podłoża pryzmach. Następuje w nim mieszanie zanieczyszczonej gleby z roztworem myjącym, oddzielenie roztworu zawierającego zanieczyszczenia od gleby, regeneracja roztworu myjącego i utylizacja wyekstrahowanych zanieczyszczeń. Podstawową wadą tej metody jest stosunkowo skomplikowana i kosztowna aparatura. Metodę tę zaleca się w tych przypadkach, gdy potrzebne jest odzyskanie substancji skażających glebę.

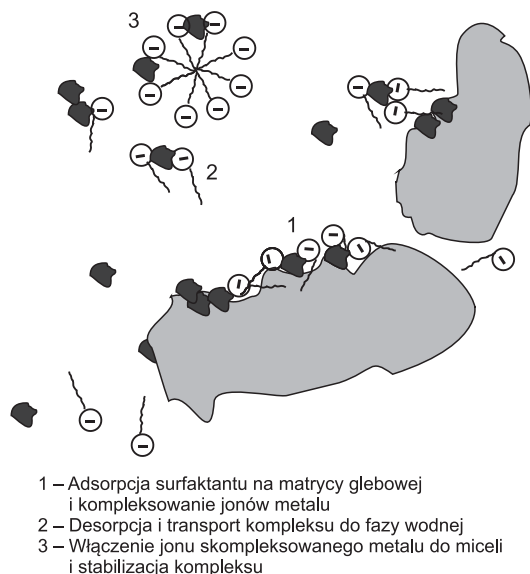


Rys. 7. Schemat procesu odmywania zanieczyszczeń z gruntu
Fig. 7. Scheme of soil washing process

Remediacja gruntów zanieczyszczonych związkami metali śladowych

Metale śladowe, takie jak kadm, miedź, ołów, rtęć, nikiel czy cynk należą do zanieczyszczeń szczególnie niebezpiecznych z uwagi na ich toksyczność, a w niektórych przypadkach także działanie mutagenne i rakotwórcze. Są poważnym obciążeniem ekosystemów wodnych i glebowych, gdyż w przeciwieństwie do zanieczyszczeń organicznych nie podlegają degradacji. Migracja pierwiastków śladowych w łańcuchu troficznym stanowi także potencjalne zagrożenie zdrowia człowieka. Niestety nie jest możliwa całkowita ich eliminacja, tak jak ma to miejsce w podczas bioremediacji środowisk skażonych zanieczyszczeniami organicznymi. Są nie tylko niebiodegradowalne, lecz także podlegają silnej adsorpcji na matrycy glebowej. Drobnoustroje mogą być jednak wykorzystane do ich przekształcenia w postać mniej podatną na migrację oraz mniej toksyczną. Jest to możliwe dzięki procesom biochemicznym zachodzącym z udziałem mikroorganizmów. Należą do nich reakcje z wydzielanymi przez mikroorganizmy metabolitami prowadzące do wytrącania nierozpuszczalnych form metali (siarczki, węglany, fosforany, szczawiany). Procesy redukcyjno-utleniające zachodzące z udziałem mikroorganizmów prowadzą do zmiany wartościowości jonów metali. Możliwa jest także mikrobiologiczna detoksykacja związków metali na drodze metylacji, która pozwala na ich przekształcenie w związki metaloorganiczne. Produkty metylacji są często lotne i mogą podlegać uwolnieniu do atmosfery. Jony metali mogą być też akumulowane wewnątrzkomórkowo przez mikroorganizmy z wykorzystaniem transportu pasywnego lub aktywnego oraz związane powierzchniowo przez komórki w wyniku oddziaływań zachodzących między metalem a grupami reaktywnymi polimerów i makrocząsteczek, z których zbudowane są osłony komórkowe mikroorganizmów. Duży wpływ na zdolność jonów metali do migracji mają zmiany pH zachodzące z udziałem mikroorganizmów oraz wydzielane przez nie substancje powierzchniowo czynne. Zadaniem współczesnych technologii oczyszczania jest wykorzystanie tych zjawisk do eliminacji pierwiastków śladowych ze środowiska do bezpiecznych postaci i ilości. Biosurfaktanty (anionowe) wykorzystywane są do odmywania i przemywania gruntów skażonych pierwiastkami śladowymi [101–104]. Związki te gromadząc się na granicy faza stała/roztwór glebowy obniżają napięcie międzyfazowe i działanie

sił kapilarnych oraz umożliwiają desorpcję i kompleksowanie kationów metali z matrycy glebowej [8]. Podstawą mechanizmu oczyszczania w tym przypadku jest tworzenie wiązań jonowych między anionowymi biosurfaktantami a kationami toksycznych jonów metali (rys. 8) [8, 101]. Wiązania te są silniejsze niż wiązania jonów metali z matrycą glebową, dlatego kompleksy metal–biosurfaktant mogą być łatwo wypłukiwane wraz z wodą odpompowaną z warstwy gruntu [39].



- 1 – Adsorpcja surfaktantu na matrycy glebowej i kompleksowanie jonów metalu
- 2 – Desorpcja i transport kompleksu do fazy wodnej
- 3 – Wiązanie jonu skompleksowanego metalu do miceli i stabilizacja kompleksu

Rys. 8. Mechanizm usuwania jonów metali ze środowiska gruntowo-wodnego z wykorzystaniem biosurfaktantów [8, 101]

Fig. 8. Mechanism of biosurfactant-assisted metal removal from water and soil environment [8, 101]

Technologiczne procesy oczyszczania są bardziej skuteczne przy wykorzystaniu wyizolowanych biosurfaktantów niż całych komórek czy egzopolimerów [102, 103]. Najczęściej do tego celu używane są biosurfaktanty małowcząsteczkowe [8]. Wynika to z niewielkich rozmiarów powstającego kompleksu biosurfaktantu i jonu metalu, który jest łatwo usuwany podczas tzw. mycia gleby, podczas gdy większe kompleksy jonów metali z egzopolimerami lub komórkami są zatrzymywane w porach gruntu [104]. Oparte na tych mechanizmach technologie remediacji stosowane są do oczyszczania gruntów zarówno w warunkach *in situ* (soil flushing) jak i *ex situ* (soil washing). W warunkach *in situ* roztwory odpowiednio dobranych biosurfaktantów wprowadzane są do gruntu, a następnie odbierane systemem drenów i rowów. Metoda *ex situ* polega natomiast na wydobyciu zanieczyszczonego gruntu, a proces jego oczyszczania odbywa się poza miejscem zanieczyszczenia. Odpłukane związki metali są następnie eliminowane z roztworu po wydzieleniu związku powierzchniowo czynnego. Dotychczas w tego typu pracach remediacyjnych najczęściej stosowane są biosurfaktanty zaliczane do glikolipidów, takie jak ramnolipidy, a także soforolipidy. Wydajność procesu remediacji zależy od bardzo wielu czynników charakteryzujących grunt, takich jak zdolność wymiany kationów, pH, rozmiar cząstek, a także od wieku i typu zanieczyszczenia oraz rodzaju użytego biosurfaktantu [105]. Proces desorpcji jonów metali może być hamowany w glebach o małej przewodności hydraulicznej, dużej heterogenności i w obecności związków silnie wiążących zanieczyszczenia [8]. W przypadku starych zanieczyszczeń ma miejsce ich stabilizacja i wówczas ich usunięcie staje się niezmiernie trudne.

Ramnolipidy należą do najczęściej stosowanych biosurfaktantów w procesie tzw. odmywania/przemywania gleby. Wykazano, że charakteryzują się one wysokim powinowactwem do szeregu pierwiastków śladowych. StABILNOŚĆ kompleksów jonów metali z ramnolipidem jest zróżnicowana. Najtrwalsze kompleksy ten biosurfaktant tworzy z jonami glinu i wapnia, natomiast słabsze z jonami rtęci [12]. Powinowactwo jonów takich metali, jak ołów czy kadm do biosurfaktantu jest większe niż do składników gleby, z którymi są one związane. Wykazano, że kompleksowanie jonów metali przez biosurfaktanty obniża ich toksyczność i pozwala na stymulację biodegradacji zanieczyszczeń organicznych w zanieczyszczonym gruncie [106]. Ramnolipidy produkowane przez szczepy *Pseudomonas aeruginosa* są wykorzystywane do selektywnego kompleksowania kationów wielu metali (Cd, Cu, As, Zn, Pb, Cr). Przydatność ramnolipidów do eliminacji pierwiastków śladowych z gleby zaobserwowało wielu badaczy [102, 103, 107]. Wykazano, że mogą one być wykorzystywane do usuwania tych zanieczyszczeń nie tylko z gleby, ale także ze skalenia i sepiolitu czy ścieków. Skuteczność procesu jest uzależniona od warunków, w jakich odbywa się oczyszczanie. Usuwanie cynku z gleby przy użyciu ramnolipidów może wynosić nawet do 98,9% przy pH=6,8 [108–110]. Zastosowanie 2% roztworu ramnolipidów przy pH=6,5 pozwoliło na wyeliminowanie 46% jonów miedzi z gleby budowlanej (w Kanadzie) i 84% miedzi z osadów jeziora (w Japonii) [111]. Analizowano także możliwość wykorzystania ramnolipidów w procesie bioremediacji odpadów kopalnianych zawierających arsen. Stwierdzono, że ramnolipidy mogą wpływać na uruchamianie jonów arsenu w środowisku zasadowym, przy czym proces ten był pozytywnie skorelowany z uruchamianiem jonów żelaza i innych metali [112, 113].

Udowodniono możliwość usuwania jednocześnie jonów kilku metali z zanieczyszczonej gleby. W eksperymencie przeprowadzonym w pracy [114] z udziałem ramnolipidów usunięto 88% ołowiu i 92% kadmu z gleby w ciągu 36 godzin. Niewielka ilość biosurfaktantu (0,1%) użytego w tym celu nie miała toksycznego wpływu na konsorcjum mikroorganizmów zasiedlających ekosystem glebowy. Ten sam typ biosurfaktantu został użyty w pracy [102] do eliminacji jonów kadmu, cynku i ołowiu z piaszczysto-ilastej gleby oraz w pracy [104] do eliminacji jonów miedzi, cynku i niklu z osadów. Zdaniem autorów tych prac skuteczność usuwania jonów metali wzrastała wraz ze wzrostem ilości ramnolipidu, natomiast środowisko zasadowe (dodatek 1% NaOH) wspomagało nawet czterokrotnie proces bioremediacji. Było to prawdopodobnie spowodowane wzrostem dostępności metali skompleksowanych z frakcją organiczną gleby, która ulega rozpuszczeniu w wyniku dodania jonów OH⁻ do osadu. Zastosowanie diramnolipidów z *Pseudomonas aeruginosa* BS2 do usuwania jonów chromu, ołowiu, kadmu, niklu i miedzi z gleby wykazało, że metale te były eliminowane z gleby selektywnie, w szeregu Cd=Cr>Pb=Cu>Ni [115].

Wprowadzie ramnolipidy są najpowszechniej stosowanymi biosurfaktantami w procesie przemywania gleby, to są jednak doniesienia na temat stosowania do tego celu innych biosurfaktantów. Wykazano na przykład zdolność surfaktyny do wiązania jonów niektórych pierwiastków (Mn, Mg, Ca, Ba, Li), a ponadto była ona szczególnie przydatna do usuwania jonów miedzi z gleby [116]. Surfaktyna i soforolipidy mogą być stosowane do usuwania jonów metali z gleby zanieczyszczonej węglowodorami [117]. Okazało

się, że surfaktyna usuwała około 70% jonów miedzi i 50% węglowodorów, podczas gdy soforolipidy usuwały 100% jonów cynku z zanieczyszczonej gleby [118]. Porównanie zdolności trzech biosurfaktantów (surfaktyna, ramnolipid, soforolipid) do usuwania jonów miedzi i cynku z osadów wykazało, że w pojedynczym płukaniu 0,5% roztworem ramnolipidu usuwano 65% jonów miedzi i 18% jonów cynku, a soforolipidem odpowiednio 25% i 60%. Najmniej skuteczna okazała się surfaktyna 4%, która usuwała odpowiednio 15% i 6% tych pierwiastków [119]. Stwierdzono, że możliwe jest wykorzystanie biosurfaktantu polimerowego bioemulsan BS29 produkowanego przez *Gordonia* sp. do usuwania jonów metali ze sztucznie zanieczyszczonej gleby. Wprawdzie najbardziej skuteczne było wymywanie jonów metali ramnolipidem, to bioemulsan był w stanie usunąć 17% jonów miedzi, 19% kadmu, 47% ołowiu, 31% cynku i 25% niklu z zanieczyszczonej gleby [61].

W nowych technologiach remediacji gleby z wykorzystaniem surfaktantów stosowane są surfaktanty w postaci piany [120, 121]. Ustalono, że użycie biosurfaktantów w tej postaci wydatnie poprawia skuteczność prowadzonych prac remediacyjnych. Dzieje się tak z powodu znacznego obniżenia gęstości i zwiększenia powierzchni międzyfazowej piany w stosunku do roztworu biosurfaktantu, co ułatwia penetrację piany przez porowate podłoże oraz zwiększa powierzchnię kontaktu cząsteczek surfaktantu z substancją stanowiącą zanieczyszczenie. Piana stanowi układ dwufazowy, w którym grupy hydrofobowe surfaktantów przenikają do fazy gazowej, natomiast grupy hydrofilowe są umiejscowione w fazie wodnej. W takim układzie ograniczona jest możliwość koalescencji pęcherzyków gazu i destabilizacji piany [8]. Piany biosurfaktantów były stosowane do oczyszczania gleby zanieczyszczonej jonami kadmu, niklu, a także arsenu [113, 120, 121]. Wykazano, że zamiana wodnego roztworu biosurfaktantu na pianę powodowała wzrost skuteczności wymywania jonów tych metali, mimo że ilość ramnolipidu w obu przypadkach była taka sama (0,5%). Wodne roztwory ramnolipidu usuwały 61,7% jonów kadmu i 51% jonów niklu, podczas gdy piana ramnolipidu usuwała odpowiednio 73,2% i 68,1% tych pierwiastków z gleby sztucznie zanieczyszczonej [120, 121]. Biosurfaktanty znajdują także zastosowanie w technologiach usuwania jonów metali z roztworów wodnych. Ultrafiltracja wspomagana przez dodanie surfaktyny pozwala na bardzo skuteczne (85÷100%) usunięcie jonów kadmu, miedzi i cynku z zanieczyszczonych wód [118].

Podsumowanie

Analiza badań przeprowadzonych w wielu laboratoriach wskazuje na możliwość zastosowania biosurfaktantów w technologiach oczyszczania wód i gruntów zanieczyszczonych węglowodorami oraz pierwiastkami śladowymi. Ze względu na wysoką aktywność powierzchniową, małą toksyczność i biodegradowalność biosurfaktanty mogą z powodzeniem zastąpić surfaktanty syntetyczne. Podstawowe kierunki ich wykorzystania to bioremediacja oraz procesy związane z ekstrakcją zanieczyszczeń na drodze odmywania/przemywania gruntu.

Informacje dotyczące wpływu surfaktantów na procesy bioremediacji są często dość rozbieżne. Okazuje się, że związki powierzchniowo czynne wykazują zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na bioremediację. Przyczyną takiego zróżnicowania wyników badań może być problem z odtworzeniem identycznych warunków

doświadczalnych. Przebieg procesu bioremediacji zależy od bardzo wielu czynników, takich jak typ gleby, jakość i liczebność mikroorganizmów, rodzaj i ilość zanieczyszczeń czy typ i ilość środka powierzchniowo czynnego. Dlatego też trudny do przewidzenia jest skutek użycia surfaktantu w procesie bioremediacji. Praktyczne wykorzystanie opracowanych technologii możliwe jest więc jedynie po wykonaniu wstępnych eksperymentów pozwalających na właściwy dobór biosurfaktantu.

Ponieważ wysoki koszt produkcji biosurfaktantów ogranicza ich powszechne stosowanie, dlatego rozważane są różne rozwiązania alternatywne. Jednym z nich jest użycie surowych nieoczyszczonych preparatów – w ten sposób unika się kosztów oczyszczania, jeśli nie jest wymagana duża czystość tych preparatów. Obniżenie kosztów można osiągnąć stosując substancje odpadowe do hodowli mikroorganizmów wydzielających biosurfaktanty. Dobre efekty daje także hodowla mikroorganizmów w warunkach *in situ* i ich wprowadzenie do gruntu w fazie optymalnej produkcji biosurfaktantu. Wytwarzanie biosurfaktantów w miejscu prowadzenia prac remediacyjnych eliminuje także koszty transportu. Niektórzy badacze zwracają uwagę na możliwość hamowania metabolizmu niektórych mikroorganizmów zasiedlających środowisko gruntowo-wodne na skutek wprowadzenia biosurfaktantów. Dlatego też preferują oni wykorzystanie do produkcji biosurfaktantów mikroorganizmów autochtonicznych, jako metodę bardziej przyjazną środowisku i mniej kosztowną. Drobnoustroje te są dobrze dostosowane do istniejących warunków środowiskowych, a wytwarzany przez nie biosurfaktant nie powinien hamować metabolizmu mikroorganizmów zasiedlających zanieczyszczone środowisko. Można także stymulować naturalną mikroflorę do produkcji biosurfaktantów bezpośrednio w glebie przez dodanie odpowiednio dobranych suplementów.

Biosurfaktanty i surfaktanty syntetyczne stosowane są zarówno do remediacji gruntów zanieczyszczonych pierwiastkami śladowymi, jak i hydrofobowymi zanieczyszczeniami organicznymi (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, trichloroeten) na drodze tzw. odmywania/przemywania. Jednakże remediacja zanieczyszczonego gruntu powinna być zawsze poprzedzona eksperymentalnym doborem warunków procesu. Skuteczność procesu uzależniona jest od wielu czynników związanych z rodzajem, ilością i wiekiem zanieczyszczenia, heterogenicznością gruntu oraz ilością i rodzajem zastosowanego surfaktantu. Adsorpcja surfaktantu przez glebę zmusza do stosowania jego większych dawek, zwiększa też zagrożenie ekologiczne. Problem ten może być wyeliminowany poprzez zastosowanie surfaktantów łatwobiodegradowalnych lub przyjaznych środowisku biosurfaktantów. W procesie tym, z uwagi na ilość zużywanego związku powierzchniowo czynnego, konieczne jest także obniżenie kosztów produkcji biosurfaktantów. Próby ich zmniejszenia polegają na odzyskiwaniu biosurfaktantu lub wielokrotnym wykorzystywaniu tej samej porcji preparatu. Proces oczyszczenia środowiska gruntowo-wodnego wspomagany jest także zabiegami natury fizyczno-chemicznej, zwiększającymi desorpcję i dostępność usuwanych zanieczyszczeń (środki utleniające, ultradźwięki, energia mikrofalowa).

Omówione zagadnienia nie zostały dotychczas wyjaśnione w wystarczającym stopniu i wymagają przeprowadzenia jeszcze wielu doświadczeń w interdyscyplinarnych zespołach badawczych.

LITERATURA

1. A. KRASOWSKA: Biomedyczna aktywność biosurfaktantów. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2010, t. 64, ss. 310–313.
2. C.N. MULLIGAN: Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2009, Vol. 14, pp. 372–378.
3. A. SINGH, J.D. van HAMMER, O.P. WARD: Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Applications aspects. *Biotechnology Advances* 2007, Vol. 25, pp. 99–121.
4. G. SOBERÓN-CHÁVEZ, R.M. MAIER: Biosurfactants: A general overview. In: G. SOBERÓN-CHÁVEZ [Ed.]: *Biosurfactants*. Springer-Verlag, Berlin (Germany) 2011, pp. 1–11.
5. K.S.M. PATTANATHU, RAHMAN, E. GAKPE: Production, characterisation and applications of biosurfactants – review. *Biotechnology* 2008, Vol. 7, No. 2, pp. 360–370.
6. E. LIWARSKA-BIZUKOJC, K. MIKSCH, A. MAŁACHOWSKA-JUTSZ, J. KALKA: Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants. *Chemosphere* 2005, Vol. 58, No. 9, pp. 1249–1253.
7. C.N. MULLIGAN: Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* 2005, Vol. 133, pp. 183–198.
8. K. PARASZKIEWICZ, J. DŁUGOŃSKI: Wykorzystanie drobnoustrojowych surfaktantów do usuwania metali ciężkich z gleby. *Biotechnologia* 2007, nr 2(77), ss. 81–94.
9. C.N. MULLIGAN, B.F. GIBBS: Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings of the Indian National Science Academy* 2004, No. 1, pp. 31–55.
10. N. KOSARIC: Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology* 2001, Vol. 39, pp. 295–304.
11. M. GUMIENNA, Z. CZARNECKI: Rola mikroorganizmów w syntezie związków powierzchniowo czynnych. *Nauka Przyroda Technologie* 2010, nr 4, ss. 1–14.
12. Z. SADOWSKI: Biogeochemia – wybrane zagadnienia. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
13. E.Z. RON, E. ROSENBERG: Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* 2001, No. 3, pp. 229–236.
14. E.V. KARPENKO, R.I. VILDANOVA-MARTSISHIN, B. KOLWZAN: The new ecologically safe biosurfactants. In: K.A. WILK [Ed.]: *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2003, pp. 55–60.
15. J. WITEK: Wpływ ramnolipidu otrzymanego z *Pseudomonas aeruginosa* BI na biodegradację produktów naftowych w układach rozproszonych. Rozprawa doktorska, Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii Środowiska, Wrocław 2011.
16. J.D. DESAI, I.M. BANAT: Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1997, Vol. 61, pp. 47–64.
17. K. MUTHUSAMY, S. GOPALAKRISHNAN, R.T. KOCHUPAPPY, P. SIVACHIDAMBARAM: Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science* 2008, vol. 94, No. 6, pp. 736–747.
18. E. ROSENBERG, E.Z. RON: High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, Vol. 52, pp. 154–162.
19. J. KRZYCZKOWSKA, E. BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK: Biotechnologiczna synteza związków powierzchniowo czynnych i przykłady ich praktycznego zastosowania. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 2012, nr 4(83), ss. 5–23.
20. Ł. CHRZANOWSKI, Ł. ŁAWNICZAK, K. CZACZYK: Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2012, Vol. 28, pp. 401–419.
21. J.-L. LI, B.-H. CHEN: Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Materials* 2009, Vol. 2, pp. 76–94.
22. T. AVRAMOVA, A. SOTIROVA, D. GALABOVA, E. KARPENKO: Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2008, Vol. 62, pp. 415–420.
23. P. WANG, A.A. KELLER: Partitioning of hydrophobic organic compounds within soil-water-surfactant systems. *Water Research* 2008, Vol. 42, pp. 2093–2101.
24. M. WOŹNIAK, R. MARECIK, Ł. ŁAWNICZAK, Ł. CHRZANOWSKI: Rhamnolipidy jako aktywna ochrona mikroorganizmów przez toksynami. *Nauka Przyroda Technologie* 2012, t. 6, z. 4, ss. 1–8.
25. E. HALLMANN: Fizykochemiczne aspekty oczyszczania zaolejonych gruntów z wykorzystaniem surfaktantów syntetycznych i biosurfaktantów. Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2008.
26. Ł. ŁAWNICZAK, K. CZACZYK, M. OWSIANIAK, Ł. CHRZANOWSKI: Rola rhamnolipidów w środowisku naturalnym. *Postępy Mikrobiologii* 2011, vol. 50, nr 1, ss. 17–30.
27. B. KOLWZAN: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania (Analysis of biofilms – their formation and functioning). *Ochrona Środowiska* 2011, vol. 33, nr 4, ss. 3–14.
28. M. GUMIENNA, M. CZARNECKA, Z. CZARNECKI: Kondensat podezodoryzacyjny, jako substrat tłuszczowy w biosyntezie związków powierzchniowo czynnych z wykorzystaniem drożdży *Candida bombicola*. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria* 2002, nr 1(2), ss. 71–82.
29. R.S. MAKAR, S.S. CAMEOTRA: An update on the unconventional substrates for the biosurfactant production and their (new) applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002, Vol. 58, No. 4, pp. 428–434.
30. R.S. MAKAR, K.J. ROCKNE: Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicity and Chemistry* 2003, Vol. 22, No. 10, pp. 2280–2292.
31. A.A. ABRAMSON: *Surface Active Agents. Synthesis, Analysis, Properties, Application*. Chimia, Leningrad 1988.
32. K. ARIMA, A. KAKINUMA, G. TAMURA: Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1968, Vol. 31, pp. 488–494.
33. E. ROSENBERG, C. RUBINOVITZ, R. LEGMANN, E.Z. RON: Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 Biodispersan. *Applied and Environmental Microbiology* 1988, Vol. 54, pp. 323–326.
34. S.K. SATPUTE, A.G. BANPURKAR, P.K. DHAKEPHALKAR, I.M. BANAT, B.A. CHOPADE: Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 2010, pp. 1–18.
35. E.V. KARPENKO, A.N. SHULGA, N.S. SHEGLOVA, S.A. ELYSSEEV, R.I. VILDANOVA-MARTSISHIN, A.A. TUROVSKY: Surface-active compounds of culture *Pseudomonas* sp. *Microbiology* 1996, Vol. 58, No. 5, pp. 18–24.
36. B. KOLWZAN: Bioremediacja gruntów skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
37. B. KOLWZAN: Biodegradacja produktów naftowych. W: J. SURYGALA [red.]: *Zanieczyszczenia naftowe w gruncie*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000.
38. P. MUDGIL: Biosurfactants for soil biology. In: A. SINGH et al. [Eds.]: *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Soil Biology 28, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2011, pp. 203–222.
39. F. VOLKERING, A.M. BREURE, W.H. RULKENS: Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 1998, Vol. 8, pp. 401–417.

40. E. KACZOREK, T. JESIONOWSKI, A. GIEC, A. OLSZANOWSKI: Cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* in the process of diesel oil biodegradation. *Biotechnology Letters* 2012, Vol. 34, pp. 857–862.
41. A. OLSZANOWSKI, E. KACZOREK, A. PIJANOWSKA, L. CHRZANOWSKI: The relation between rhamnolipid adsorption on yeast and bacterial strains, hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. *Fresenius Environmental Bulletin* 2006, Vol. 15, No. 7, pp. 682–686.
42. L. CHRZANOWSKI, M. OWSIANIAK, A. SZULC, R. MARECKI, A. PIOTROWSKA-CYPLIK, A.K. OLEJNIK-SCHMIDT, J. STANIEWSKI, P. LISIECKI, F. CIESIELCZYK, T. JESIONOWSKI, H.J. HEIPIEPER: Interaction between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of model hydrocarbon-rich effluent. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2011, Vol. 65, pp. 605–611.
43. L. CHRZANOWSKI, E. KACZOREK, A. OLSZANOWSKI: Relation between *Candida maltosa* hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2005, Vol. 21, pp. 1273–1277.
44. E. KACZOREK, L. CHRZANOWSKI, A. PIJANOWSKA, A. OLSZANOWSKI: Yeasts and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins. *Bioresource Technology* 2008, Vol. 99, pp. 4285–4291.
45. P. CHEN, M.A. PICKARD, M.R. GRAY: Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. *Biodegradation* 2000, Vol. 11, pp. 341–347.
46. B. KOŁWZAN, K. GRABAS, E. ŚLIWKA: Selection of surfactants for the hydrocarbon biodegradation stimulation. In: H. GÓRECKI *et al.* [Eds.]: *Chemicals in Sustainable Agriculture*, Vol. 4, Prague Brussels Stockholm 2003, pp. 568–575.
47. B. KOŁWZAN, E. KARPENKO, R. VIDANOVA-MARTSISHIN, E. ŚLIWKA, K. GRABAS: Influence of biosurfactants on biodegradation of petroleum hydrocarbons. In: K.A. WILK [Ed.]: *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2003, pp. 383–388.
48. K. GRABAS, B. KOŁWZAN, E. ŚLIWKA, E. NOWICKA: Synthetic surfactant-stimulated biodegradation of selected fractions of crude oil. In: K.A. WILK [Ed.]: *Surfactants and Dispersed Systems in Theory and Practice*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2003, pp. 377–382.
49. K. GRABAS, B. KOŁWZAN, E. ŚLIWKA: Zastosowanie surfaktantów do stymulacji biodegradacji produktów naftowych. W: *Technologie odolejania gruntów, odpadów, ścieków*. Wydawnictwo Naukowe Gabriel Borowski, Warszawa 2003, ss. 80–87.
50. F. CZECHOWSKI, B. KOŁWZAN: Biodegradacja ropy naftowej z otworu Radoszyn-1 przez mikroorganizmy glebowe. W: B. KOŁWZAN, K. GRABAS [red.]: *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*. PZITS Oddział Dolnośląski, Wrocław 2008, ss. 69–74.
51. L.M. WANG, P.W.G. LIU, C.C. MA, S.S. CHENG: Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials* 2008, Vol. 151, pp. 155–163.
52. D.M. FALATKO, J.T. NOVAK: Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environment Research* 1992, Vol. 64, pp. 163–169.
53. A. ABALOS, M. VINAS, J. SABATE, M.A. MANRESA, A.M. SOLANAS: Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 2004, Vol. 15, pp. 249–260.
54. C.C. LAI, Y.C. HUANG, Y.H. WEI, J.S. CHANG: Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 2009, Vol. 167, pp. 609–614.
55. G. PASTERNAK, B. KOŁWZAN: Surface tension and toxicity changes during biodegradation of carbazole by newly isolated methylotrophic strain *Methylobacterium* sp. GPE1. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013, Vol. 84, pp. 143–149.
56. E. ŚLIWKA, B. KOŁWZAN, K. GRABAS, E. KARPENKO, P. RUTKOWSKI: Influence of rhamnolipids from *Pseudomonas* PS-17 on coal tar and petroleum residue biodegradation. *Environment Protection Engineering* 2009, Vol. 35, No. 1, pp. 139–150.
57. S.W. KANG, Y.B. KIM, J.D. SHIN, E.K. KIM: Enhanced biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial biosurfactant, sophorolipid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2010, Vol. 160, pp. 780–790.
58. V.S. MILLIOLI, E.C. SERVULO, L.G. SOBRAL, D.D. CARVALHO: Bioremediation of crude oil-bearing soil: Evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. *Global NEST Journal* 2009, Vol. 11, pp. 181–188.
59. A. OBERBREMER, R. MUHLER-HURTIG, F. WAGNER: Effect of addition of microbial surfactant on hydrocarbon degradation in soil population in a stirrer reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990, Vol. 32, pp. 485–489.
60. J.C. MATA-SANDOVAL, J. KARNS, A. TORRENTS: Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on the biodegradation of three pesticides in aqueous and soil slurries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, Vol. 49, pp. 3296–3303.
61. A. FRANZETTI, P. CAREDDA, C. RUGGERI, L.A.P. COLLA, E. TAMBURINI, M. PAPACCHINI, G. BESTETTI: Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 2009, Vol. 75, pp. 801–807.
62. M.A. CUBITTO, A.C. MORAN, M. COMMENDATORE, M.N. CHIARELLO, M.D. BALDINI, F. SENERIZ: Effect of *Bacillus subtilis* 09 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation* 2004, Vol. 15, pp. 281–287.
63. K. URUM, T. PEKDEMIR, M. COPUR: Surfactants treatment of crude oil contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004, Vol. 276, pp. 456–464.
64. K. SCHEIBENBOGEN, R.G. ZYTNER, H. LEE, J.T. TREVORS: Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1994, Vol. 59, pp. 53–59.
65. Z. LIU, A.M. JACOBSON, R.G. LUTHY: Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Applied and Environmental Microbiology* 1995, Vol. 61, pp. 145–51.
66. R. BEAL, W.B. BETTS: Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology* 2000, Vol. 89, pp. 158–68.
67. R.M. MAIER, G. SOBERÓN-CHÁVEZ: *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000, Vol. 54, pp. 625–633.
68. W.H. NOORDMAN, D.B. JANSSEN: Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, Vol. 68, pp. 4502–4508.
69. K.S.M. RAHMAN, T.J. RAHMAN, Y. KOURKOUTAS, I. PETSAS, R. MARCHANT, I.M. BANAT: Enhanced bioremediation of n-alkane petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology* 2003, Vol. 90, pp. 159–168.

70. E. KACZOREK, M. URBANOWICZ, A. OLSZANOWSKI: The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophyla* during diesel oil biodegradation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, Vol. 81, pp. 363–368.
71. J.D. van HAMME, O.P. WARD: Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. *Canadian Journal of Microbiology* 1999, Vol. 45, pp. 130–137.
72. M. PIĘTKA-OTTLIK, R. FRĄCOWIAK, I. MALISZEWSKA, B. KOLWZAN, K.A. WILK: Ecotoxicity and biodegradability of antielectrostatic dicephalic cationic surfactants. *Chemosphere* 2012, Vol. 89, No. 9, pp. 1103–1111.
73. B. KOLWZAN, J. BIAZIK, A. CZARNY, E. ZACZYŃSKA, E. KARPENKO: Ocena toksyczności biosurfaktantów produkowanych przez *Pseudomonas* sp. PS-17. W: B. KOLWZAN, K. GRABAS [red.]: Ekotoksykologia w ochronie środowiska. PZITS Oddział Dolnośląski, Wrocław 2008, ss. 191–196.
74. K.H. SHIN, Y. AHN, K.W. KIM: Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005, Vol. 24, pp. 2768–2774.
75. G. MALINA: Likwidacja zagrożenia środowiska gruntowo-wodnego na terenach zanieczyszczonych. Monografie nr 132, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2007.
76. J.H. CHANG, Z. QIANG, C.-P. HUANG, A.V. ELLIS: Phenanthrene removal in unsaturated soils treated by electrokinetics with different surfactants-Triton X-100 and Rhamnolipid. *Colloids and Surfaces A* 2009, Vol. 348, pp. 157–163.
77. T. BARKAY, S. NAVON-VENEZIA, E.Z. RON, E. ROSENBERG: Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, Vol. 65, pp. 2697–2702.
78. C. SCHIPPERS, K. GEBNER, T. MULLER, T. SCHEPER: Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *Journal of Biotechnology* 2000, Vol. 83, pp. 189–198.
79. K.H. SHIN, K.W. KIM, Y. AHN: Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process. *Journal of Hazardous Materials* 2006, B. 137, pp. 1831–1837.
80. F.J. OCHOA-LOZA, W.H. NOORDMAN, D.B. JANNSEN, M.L. BRUSSEAU, R.M. MAIER: Effect of clays, metal oxides, and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. *Chemosphere* 2007, Vol. 66, pp. 1634–1642.
81. Y. ZHANG, R.M. MILLER: Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 1995, Vol. 6, pp. 2247–2251.
82. J.T. CHAMPTION, J.C. GILKEY, H. LAMPARSKI, J. RETTERER, R.M. MILLER: Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effect of pH, cadmium, and octadecane. *Journal of Colloid and Interface Science* 1995, Vol. 170, pp. 569–574.
83. Y. ISHIGAMI, H. GAMA, H. NAGAHORA: The pH-sensitive conversion of molecular aggregated of rhamnolipid biosurfactant. *Chemistry Letters* 1987, Vol. 5, pp. 763–766.
84. A. PERFUMO, I.M. BANAT, R. MARCHANT, L. VEZ-ZULLI: Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil. *Chemosphere* 2007, Vol. 66, pp. 179–184.
85. G.Y. BAI, M.L. BRUSSEAU, R.M. MILLER: Influence of cation type, ionic strength, and pH on solubilisation and mobilisation of residual hydrocarbon by a biosurfactant. *Journal of Contaminant Hydrology* 1998, Vol. 30, pp. 265–279.
86. K. HOLMBERG: Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2001, Vol. 6, No. 2, pp. 148–159.
87. S. DESHPANDE, B.J. SHIAU, D. WADE, D.A. SABATINI, J.H. HARWELL: Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water Research* 1990, Vol. 33, pp. 351–360.
88. D. CESARE, J.A. SMITH: Surfactant effects on desorption rate of nonionic organic compounds from soils to water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 1994, Vol. 134, pp. 1–29.
89. W. CHU: Remediation of contaminated soils by surfactant-aided soil washing. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 2003, Vol. 7, pp. 19–24.
90. R.E. SAICHEK, K.R. REDDY: Electrokinetically enhanced remediation of hydrophobic organic compounds in soils: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2005, Vol. 35, pp. 115–92.
91. A. SHULGA, E. KARPENKO, R. VILDANOVA-MARTSISHIN, A. TUROVSKY, M. SOLTYS: Biosurfactant-enhanced remediation of oil-contaminated environments. *Adsorption Science & Technology* 2000, Vol. 18, No. 2, pp. 171–176.
92. H.M. POGGI-VARALDO, N. RINDERKNECHT-SEIJAS: A differential availability enhancement factor for the evaluation of pollutant availability in soil treatments. *Acta Biotechnologica* 2003, Vol. 23, pp. 271–80.
93. M. GARCIA-JUNCO, C. GÓMEZ-LAHOZ, J.-L. NIQUI-ARROYO, J.-J. ORTEGO-CALVO: Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology* 2003, Vol. 37, pp. 2988–2996.
94. C.N. MULLIGAN, F. EFTEKHARI: Remediation with surfactant foam of PCP contaminated soil. *Engineering Geology* 2003, Vol. 70, pp. 269–279.
95. G.Y. BAI, M.L. BRUSSEAU, R.M. MILLER: Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *Journal of Contaminant Hydrology* 1997, Vol. 25, pp. 157–170.
96. K. URUM, T. PEKDEMIR, M. COPUR: Optimum conditions for washing of crude oil-contaminated soil with biosurfactant solutions. *Process Safety and Environmental Protection* 2003, Vol. 81, pp. 203–209.
97. C. VIPULANANDAN, X. REN: Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering* 2000, Vol. 126, pp. 629–634.
98. S.S. CAMEOTRA, J.-M. BOLLAG: Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2003, Vol. 30, pp. 111–26.
99. K. URUM, T. PEKDEMIR: Evaluation of biosurfactant for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 2004, Vol. 57, pp. 1139–1150.
100. M.S. KUYUKINA, I.B. IVSHINA, S.O. MAKAROV, L.V. LITVINENKO, C.J. CUNNINGHAM, J.C. PHILP: Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilisation in a soil system. *Environment International* 2005, Vol. 31, pp. 155–161.
101. R.M. MILLER: Biosurfactant facilitated remediation of contaminated soil. *Environmental Health Perspectives* 1995, Vol. 105 (suppl. 1), pp. 59–62.
102. D.C. HERMAN, J.F. ARTIOLA, R.M. MILLER: Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science & Technology* 1995, Vol. 29, pp. 2280–2285.
103. H. TAN, J.T. CHAMPTION, J.F. ARTIOLA, M.L. BRUSSEAU, R.M. MILLER: Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental Science & Technology* 1994, Vol. 28, pp. 2402–2406.
104. B. DRAHAZMA, C.N. MULLIGAN: Investigation of the removal of heavy metals from sediments using rhamnolipid in a continuous flow configuration. *Chemosphere* 2007, Vol. 69, pp. 705–711.
105. P. SINGH, S.S. CAMEOTRA: Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004, Vol. 319, pp. 291–297.

106. T.R. SANDRIN, R.M. MAIER: Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives* 2003, Vol. 111, pp. 1093–1100.
107. J.L. TORRENS, D.C. HERMAN, R.M. MILLER-MAIER: Biosurfactant (rhamnolipid) sorption and the impact on rhamnolipid-facilitated removal of cadmium from various soils under saturated flow conditions. *Environmental Science & Technology* 1998, Vol. 32, No. 6, pp. 776–781.
108. Y. AŞÇI, M. NURBAŞ, Y.S. AÇIKEL: Investigation of sorption/desorption equilibria of heavy metal ions on/from quartz using rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Environmental Management* 2010, Vol. 91, pp. 724–731.
109. Y. AŞÇI, M. NURBAŞ, Y.S. AÇIKEL: A comparative study for the sorption of Cd(II) by soils with different clay contents and mineralogy and the recovery of Cd(II) using rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Hazardous Materials* 2008, Vol. 154, pp. 663–673.
110. Y. AŞÇI, M. NURBAŞ, Y.S. AÇIKEL: Removal of zinc ions from a soil component Na-felspar by a rhamnolipid biosurfactant. *Desalination* 2008, Vol. 223, pp. 361–365.
111. C.N. MULLIGAN, C. OGHENEKEVWE, M. FUKUE, Y. SHIMIZU: Biosurfactant enhanced remediation of mixed contaminated soil and metal contaminated sediment. Proc. of Seventh Geoenvironmental Engineering Seminar, Grenoble (France) 2007.
112. S. WANG, C.N. MULLIGAN: Rhamnolipid biosurfactant enhanced soil flushing for the removal of arsenic and heavy metals from mine tailings. *Process Biochemistry* 2009, Vol. 44, pp. 296–301.
113. C.N. MULLIGAN, S. WANG: Remediation of heavy metal-contaminated soil by rhamnolipid foam. *Engineering Geology* 2006, Vol. 85, pp. 75–81.
114. A.A. JUWARKAR, A. NAIR, K.V. DUBEY, S.K. SINGH, S. DEVOTTA: Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere* 2007, Vol. 68, pp. 1996–2002.
115. A.A. JUWARKAR, K.V. DUBEY, A. NAIR, S.K. SINGH: Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant – a novel approach. *Indian Journal of Microbiology* 2008, Vol. 48, pp. 142–146.
116. L. THIMON, F. PEYPOUX, G. MICHEL: Interactions of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*, with inorganic cations. *Biotechnology Letters* 1992, Vol. 14, pp. 713–718.
117. C.N. MULLIGAN, R.N. YONG, B.F. GIBBS: On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil-contaminated soil. *Environmental Progress* 1999, Vol. 18, pp. 50–54.
118. C.N. MULLIGAN, R.N. YONG, B.F. GIBBS, S. JAMES, H.P.J. BENNETT: Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environmental Science & Technology* 1999, Vol. 33, pp. 3812–3820.
119. C.N. MULLIGAN, R.N. YONG, B.F. GIBBS: Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials* 2001, Vol. 85, pp. 111–125.
120. S. WANG, C.N. MULLIGAN: Rhamnolipid foam enhanced remediation of cadmium and nickel contaminated soil. *Water, Air & Soil Pollution* 2004, Vol. 157, pp. 315–330.
121. S. WANG, C.N. MULLIGAN: An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. *Chemosphere* 2004, Vol. 57, pp. 1079–1089.

Kolwzan, B. Possible Biosurfactant Applications in Water and Soil Remediation Processes. *Ochrona Srodowiska* 2014, Vol. 36, No. 3, pp. 3–18.

Abstract: Biosurfactant production is mainly related to hydrophobic nutrient uptake by microorganisms. It was demonstrated that biosurfactants might successfully substitute for synthetic surface-active agents not only in different branches of industry, medicine and agriculture but also in the environmental field. Bioremediation and processes related to extraction of contaminants via so called soil flushing are their principal applications in the environmental protection. Biosurfactants increase the mineral oil hydrocarbon solubility, allowing for their use as nutrients by microorganisms.

Biosurfactants are also useful in processes of dense non-aqueous-phase liquid (DNAPL) removal from soil by means of soil flushing. Moreover, anionic biosurfactants may also be used for so called washing of soils contaminated with trace metals. Efficacy of the contaminated soil remediation with biosurfactants depends on many biological and physico-chemical factors, related to e.g. the contamination type, concentration and its age, soil heterogeneity as well as type and concentration of the biosurfactant used. Due to the amounts of surface-active agent used it is necessary to further reduce the costs of biosurfactant production.

Keywords: Microorganism, hydrophobic organic compounds, metals, bioremediation, soil washing, soil flushing.