

WPŁYW JONÓW ŻELAZA NA BIODEGRADACJĘ WĘGLOWODORÓW OLEJU NAPĘDOWEGO

EWA KWAPISZ, ANETA PIĄTKOWSKA, MAŁGORZATA PIOTROWICZ-WASIAK,
JACEK POLAK, STANISŁAW BIELECKI

Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii Technicznej,
90-924 Łódź, ul. Stefanowskiego 4/10

Keywords: bioremediation, petroleum oil contamination, biodegradation.

EFFECT OF FERRIC IONS ON BIODEGRADATION OF PETROLEUM OIL HYDROCARBONS

Heavy metal contamination often accompanies pollution with petroleum oil derivatives. Metal ions may considerably affect the process of hydrocarbon biodegradation. The results obtained for bacterial strains *Gordonia alkanivorans* S7 and *Pseudomonas fluorescens* SL3 indicated the limitation of cell growth and reduced ability of degradation of petroleum oil hydrocarbons in the presence ferric ions in the range of 15–100 mg Fe/dm³. However, the addition of these ions in the range of 1–7 mg Fe/dm³ might appear to be advantageous for biodegradation process. Supplementation with ferric ions in the range of 50–100 mg Fe/dm³ decreases emulsifying activity of tested strains. The excess of these ions is accumulated in the bacterial cells.

Streszczenie

Skażeniom substancjami ropopochodnymi często towarzyszą zanieczyszczenia metalami ciężkimi. Ich obecność może mieć znaczny wpływ na proces biodegradacji węglowodorów. Wyniki uzyskane dla szczepów *Gordonia alkanivorans* S7 i *Pseudomonas fluorescens* SL3 jednoznacznie wskazują, że obecność jonów żelaza w stężeniach 15–100 mgFe/dm³ powoduje ograniczenie wzrostu i zdolności do degradacji węglowodorów oleju napędowego. Jakkolwiek dodatek tych jonów w ilości 1–7 mgFe/dm³ może okazać się korzystny dla procesu biodegradacji. Dawki jonów żelaza w ilości 50–100 mg Fe/dm³ ograniczają aktywność emulgacyjną szczepów. Nadmiar tych jonów kumulowany jest w komórkach badanych szczepów.

WSTĘP

Jony metali (w tym ciężkich) często towarzyszą zanieczyszczeniom substancjami ropopochodnymi i ze względu na ich toksyczność dla mikroorganizmów mogą niekorzystnie wpływać na proces biodegradacji węglowodorów. Obecność w środowisku takich metali jak Fe, Ca, Mg, Ni, Mn, Zn, Hg, Pb w pewnym zakresie stężeń może okazać się korzystna, natomiast w nadmiarze jony te mogą stanowić zagrożenie dla ekosystemu. Szczególnie toksyczne okazać się mogą ołów i rtęć [2, 3, 8,].

Do najważniejszych metali występujących zarówno w środowiskach geochemicznych jak i przyrodniczych należy żelazo. Jest ono podstawowym składnikiem decydującym o funkcjonowaniu wielu białek enzymatycznych i ich kofaktorów. Stanowi główny element strukturalny systemów przenoszenia tlenu, transportu elektronów i syntezy DNA. Żelazo jest ważnym ogniwem biorącym udział w procesach odtwarzania energii (ATP), w łańcuchu oddechowym i fosforylacji. Wchodzi w skład białek żelazo-siarkowych i cytochromów.

Nadmiar żelaza w komórce może prowadzić do zaburzeń metabolizmu polegających między innymi na zmniejszeniu pobierania i ograniczeniu funkcji innych metali. Żelazo może być kumulowane w komórkach. Jony żelaza trójwartościowego, w dużych stężeniach powodują denaturację białek. Żelazo ze względu na swoje właściwości może pełnić rolę katalizatora w reakcjach prowadzących do powstania wolnych rodników hydroksylujących w obecności aktywnych form tlenu. Wolne rodniki inicjują reakcję łańcuchową, prowadzącą do inaktywacji enzymów, ich uszkodzenia, mutacji, a nawet śmierci komórek [4, 6–8].

W warunkach naturalnych żelazo może występować na dwóch stopniach utlenienia: Fe^{2+} i Fe^{3+} , przy czym sole Fe^{2+} są mało stabilne. W kwaśnych gruntach trwale są związki Fe^{3+} w postaci tlenków, wodorotlenków i fosforanów. Najwyższe stężenia metali występują w glebach kwaśnych, ponieważ rozpuszczalność soli tych metali rośnie wraz z obniżającym się pH gleby. W Polsce jest przewaga gleb kwaśnych.

Celem doświadczeń było zbadanie wpływu obecności jonów żelaza na proces biodegradacji węglowodorów oleju napędowego przez dwa szczepy bakterii *Gordonia alkanivorans* S7 i *Pseudomonas fluorescens* SL3. Badania obejmowały określenie wpływu dawki tych jonów na wzrost drobnoustrojów, zużycie węglowodorów, zdolność do tworzenia emulsji. Podjęto również próbę określenia ilości żelaza wiązanego w komórkach badanych drobnoustrojów.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Materiałem biologicznym stosowanym w doświadczeniach były szczepy należące do Kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej, wyizolowane z prób skażonych odpadami petrochemicznymi: *G. alkanivorans* S7 i *P. fluorescens* SL3.

Hodowle wstrząsane badanych szczepów prowadzono w podłożu płynnym, zawierającym jako źródło węgla olej napędowy w stężeniu 6%. Źródłem azotu był chlorek amonu. Próby prowadzono w kolbach płaskodennych o pojemności 500 cm³, wypełnionych 40 cm³ podłoża. Temperatura hodowli wynosiła 30°C. Parametry wytrząsania: 200 obr/min, amplituda 4,5 cm. Żelazo do podłoża dodawane było w formie $FeCl_3$.

Pomiar stężenia białka prowadzono metodą Bradforda [1]. Istotą oznaczenia jest zmiana barwy roztworu błękitu brylantowego w zależności od stężenia białka w danej próbce. Pomiar ten traktowano jako wskaźnik namnożenia biomasy drobnoustrojów.

Do określenia stopnia zużycia węglowodorów podczas hodowli posługiwano się metodą wagową. Po poddaniu zawiesiny hodowlanej wirowaniu (40 000×g, temp. 4°C, czas 20 min.) zbierano warstwę olejową i ważono. W obliczeniach uwzględniano częściowe odparowanie substratu podczas hodowli.

Oznaczenie aktywności emulgacyjnej polegało na określeniu zmiany poziomu absorbancji w mieszaninie reakcyjnej o składzie: 3 cm³ płynu pohodowlanego (po

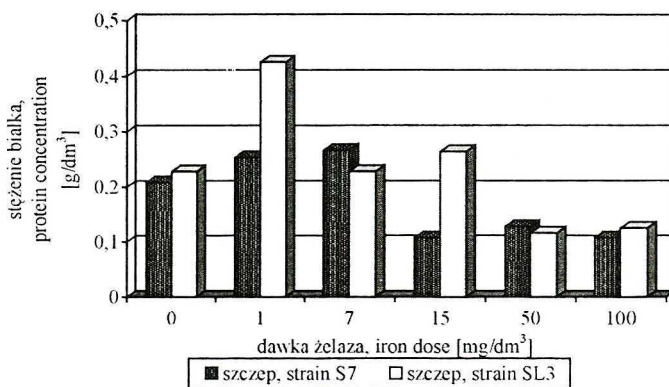
odwirowaniu biomasy), 0,5 cm³ buforu Tris-HCL, pH 7,2, 0,25 cm³ 2 MMgSO₄, 0,1 cm³ oleju napędowego, 0,3 cm³ wody destylowanej. Całość wytrząsano w ciągu 1 h w temp. 30°C na wytrząsarce przy 200 obr/min. Uzyskany w tym czasie stopień emulgacji węglowodorów oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 540 nm.

Pomiar zawartości żelaza w płynie pochodzącym z hodowli prowadzono metodą spektrofotometryczną z 1,10-fenantroliną. Pomiaru dokonywano przy długości fali 518 nm, wobec wody destylowanej.

Rozdział węglowodorów prowadzono przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett-Packard 5890, wyposażonego w kolumnę kapilarną HP-1 o długości 10 m i I.D. 0,53 mm oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny. Temperatura nastrzyku – 350°C, temp. detektora 300°C, program temperaturowy: 40°C przez 2 min, 40°C → 260°C z szybkością 4°C/min, 260°C przez 10 min.

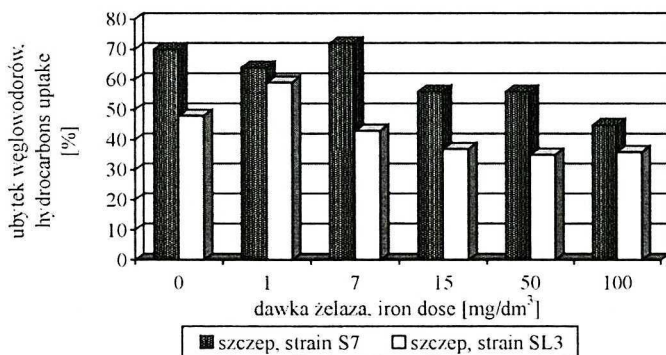
OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Z danych literaturowych wiadomo, że nadmiar jonów metali w środowisku bytowania mikroorganizmów niekorzystnie wpływa na ich rozwój, a w przypadku drastycznego przekroczenia dawek jonów metali ciężkich może dojść do wyginiecia populacji [2, 3, 8]. Zjawisko to nabiera szczególnego znaczenia w sytuacji obciążenia środowiska substancjami ropopochodnymi. Obecność jonów metali ciężkich może w tych warunkach poważnie ograniczyć biodegradację węglowodorowego substratu. Szczególną rolę w skażonym węglowodorami środowisku odgrywają jony żelaza, które w niskich stężeniach mogą wspomagać wzrost drobnoustrojów, aktywować układ oddechowy, natomiast w wyższych ograniczać aktywność enzymów i wpływać negatywnie na biodegradację. Badania przeprowadzono z udziałem dwóch szczepów *G. alkanivorans* S7 i *P. fluorescens* SL3. Szczep *G. alkanivorans* S7 wykazuje wysoką aktywność degradacyjną w stosunku do szerokiej gamy węglowodorów, natomiast szczep *P. fluorescens* SL3 preferuje węglowodory cięższe [5]. Wyniki hodowli badanych szczepów w podłożach zawierających jako źródło węgla olej napędowy w stężeniu 6% i jony żelaza trójwartościowego w stężeniach 1, 7, 15, 50 i 100 mg Fe/dm³ przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Wpływ stężenia żelaza w podłożu hodowlanym na wzrost mikroorganizmów
The effect of iron concentration in the culture medium on the growth of microorganisms

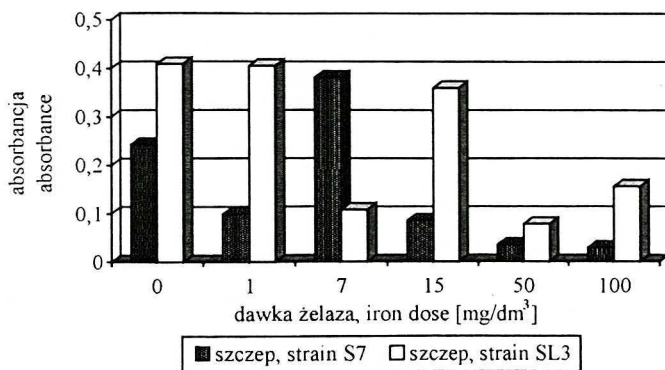
Zaobserwowano wyraźny związek między zawartością żelaza w pożywce, a wzrostem mikroorganizmów. Przyrost biomasy w określonych warunkach jest cechą indywidualną szczepu. W przypadku szczepu S7 dawki żelaza 1 i 7 mg Fe/dm³ korzystnie wpływają na wzrost bakterii, dla szczepu SL3 najkorzystniejsza okazała się dawka żelaza wynosząca 1 mg Fe/l. Dalsze zwiększanie stężeń żelaza do 50 i 100 mg Fe/dm³ powoduje ograniczenie wzrostu drobnoustrojów o 50–60% w odniesieniu do prób kontrolnych.



Rys. 2. Ubytek węglowodorów ogółem w zależności od dawki żelaza
The effect of iron dose on total hydrocarbons uptake

Dane zawarte na rysunku 2 wskazują, że dawki jonów żelaza rzędu 1–7 mg Fe/dm³ mogą korzystnie wpływać na degradację węglowodorów, dalszy wzrost stężenia tych jonów w zakresie od 15 do 100 mg Fe/dm³ powoduje jednak wyraźne obniżenie stopnia biodegradacji związków ropopochodnych. Wobec dawki żelaza 100 mg Fe/dm³ spadki wykorzystania węglowodorów dla szczepów S7 i SL3 wynoszą odpowiednio 25 i 12 jednostek procentowych.

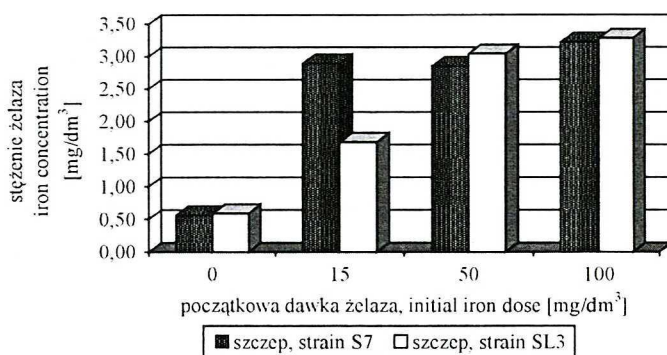
Poddawane badaniom szczepy *G. alkanivorans* S7 i *P. fluorescens* SL3 charakteryzują się różną zdolnością do syntezy emulgatorów. Szczep S7 wykazuje w hodowlach z olejem napędowym niższą aktywność emulgacyjną w porównaniu ze szczepem SL3. Uzyskane wyniki wskazują na znaczny wpływ obecności żelaza na aktywność emulgacyjną badanych szczepów. Można uznać, że żelazo w zakresie stężeń 1–100 mg Fe/dm³ powoduje obniżenie produkcji biosurfaktantów i zależność tę obserwowano dla obu badanych szczepów (Rys. 3).



Rys. 3. Zmiana aktywności emulgacyjnej w zależności od dawki żelaza
The effect of iron dose on emulsifying activity

Żelazo w stężeniu 50 i 100 mg Fe/dm³ powoduje 6 i 8-krotne obniżenie aktywności emulgacyjnej w stosunku do próby kontrolnej w przypadku szczepu S7, natomiast dla szczepu SL3 obserwowano odpowiednio 3 i 5-krotny spadek wartości tego parametru.

Ciekawych obserwacji dostarczyły doświadczenia polegające na oznaczeniu stężenia jonów żelaza w płynach po hodowlach z zastosowaniem różnych dawek jonów żelaza. Jak wiadomo, żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do życia, lecz po przekroczeniu dawek dopuszczalnych staje się czynnikiem działającym niekorzystnie i mogącym prowadzić do śmierci komórek. Mikroorganizmy mogą do pewnego stopnia bronić się przed nadmiarem żelaza przez kumulowanie go w ferrytynie. Ubytek jonów żelaza w płynie pohodowlanym nie musi więc oznaczać wykorzystania go w procesach życiowych, lecz może być efektem kumulowania go w ferrytynie [7]. Podczas badań stężenia jonów żelaza w płynach pohodowlanych badanych szczepów (po odwirowaniu komórek), zaobserwowano ciekawe zjawisko redukcji zawartości żelaza do pewnego poziomu wynoszącego około 2,8–3,3 mg Fe/dm³, mimo, że dawki początkowe tych jonów były znacznie wyższe i wynosiły 15, 50 i 100 mg Fe/dm³. Stężenia jonów żelaza w płynach po 12 dniach hodowli badanych szczepów w podłożach z wyżej wymienionymi dawkami jonów tego metalu pokazane są na rysunku 4.



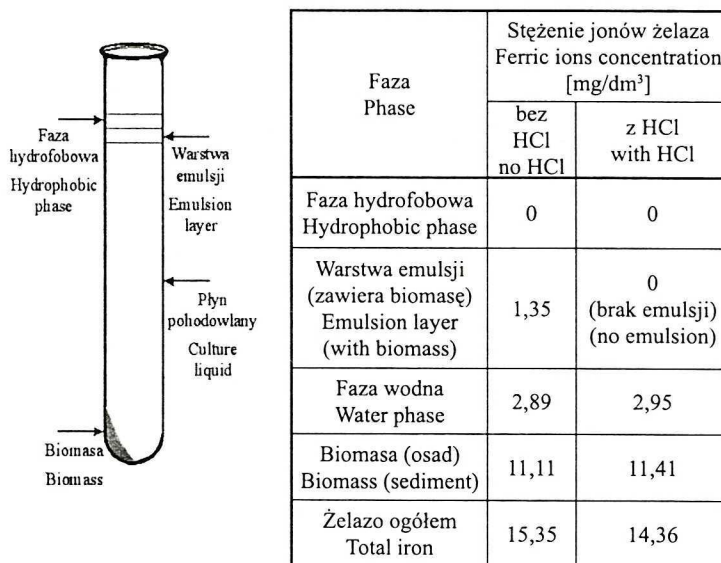
Rys. 4. Stężenia jonów żelaza w płynach pohodowlanych w zależności od początkowej jego dawki
The effect of initial iron dose on its concentration in culture liquid

Przedstawione dane wskazują, że badane szczepy najprawdopodobniej posiadają zdolność do redukcji stężenia jonów żelaza w środowisku, do poziomu zbliżonego do fizjologicznego kumulując je w komórkach. Dla sprawdzenia tej tezy konieczne było przeprowadzenie bilansu stężeń jonów żelaza we wszystkich składowych zawiesinach hodowlanej tj. fazie wodnej, fazie hydrofobowej, w warstwie emulsji i biomasy.

Rozdział analizowanych frakcji uzyskano poddając wirowaniu zawiesinę komórek przy 40000×g, w temperaturze 4°C w czasie 20 minut. Wyniki bilansu stężeń jonów żelaza w poszczególnych frakcjach płynu po hodowli *G. alkanivorans* S7 w obecności 15 mg Fe/dm³ przedstawione są na rysunku 5.

Na wiązanie jonów żelaza w komórkach duży wpływ ma pH środowiska, w związku z tym oznaczenia przeprowadzono w próbach bez i z dodatkiem kwasu solnego, więc pH prób wynosiło odpowiednio 6,2 i 2,2. Wyniki oznaczeń wskazują jednoznacznie na zdolność szczepu *Gordonia alkanivorans* do kumulacji jonów żelaza w komórkach. Niemal 80% dawki początkowej jonów żelaza odnaleziono w biomasy, a jedynie 20% pozostawało w

plynie pohodowlanym. Mimo „unieczynnienia” znacznej części żelaza w biomase, komórki wyrosłe w tych warunkach wykazują ograniczony wzrost i obniżoną aktywność degradacyjną. Generalnie jednak zjawisko kumulacji jonów żelaza należy uznać za korzystne, bowiem usunięcie z podłoża nadmiaru jonów żelaza pozwolić może na rozwój w skażonym środowisku innych drobnoustrojów lub następnych generacji drobnoustrojów bez wykazywania przy tym ograniczonego wzrostu i aktywności degradacyjnej. Mimo tej umiejętności komórki wyrosłe w tych warunkach wykazują ograniczony wzrost i obniżoną aktywność degradacyjną.



Rys. 5. Bilans stężeń jonów żelaza w poszczególnych frakcjach płynu po hodowli *G. alkanivorans* S7 w obecności 15 mg Fe mg/dm³

The balance of ferric ions concentration in particular fractions of *G. alkanivorans* S7 culture liquid in the presence of iron dose 15 mg/dm³

W celu dokładniejszego sprawdzenia wpływu obecności jonów żelaza w podwyższonych stężeniach na zdolności degradacyjne badanych szczepów wykonano analizę chromatograficzną produktów degradacji oleju napędowego, prowadzonej w obecności tych jonów. Analiza polegała na porównaniu powierzchni pików odpowiadających wybranym węglowodorom, występującym w oleju napędowym w największych stężeniach, w próbach po biodegradacji prowadzonej w obecności 100 mg Fe/dm³ i w próbie kontrolnej. Wyniki obliczeń uzyskanych dla obu badanych szczepów przedstawiono w tabeli 1.

Analizując wyniki uzyskane dla szczepu *G. alkanivorans* S7, można stwierdzić, że dodatek żelaza w stężeniu 100 mg Fe/dm³ powoduje obniżenie zużycia wszystkich z badanych węglowodorów i średni spadek ich wykorzystania wynosi 19%. Nieco inaczej zachowuje się w tych warunkach szczep *P. fluorescens* SL3. Zaobserwować tu można wzrost zużycia niektórych węglowodorów lżejszych i poważne ograniczenie wykorzystania węglowodorów cięższych, poczynając od dokošanu.

Tab. 1. Procent zużycia węglowodorów oleju napędowego przez szczepy S7 i SL3 w próbie kontrolnej i w próbach z dodatkiem żelaza

The uptake of petroleum oil hydrocarbons by strains S7 and SL3 in the control samples and samples supplemented with iron

Węglowodór Hydrocarbon	Próba kontrolna Reference sample			100 mg Fe/dm ³		
	Czas retencji Retention time [min]	Powierzchnia piku Peak area	Zużycie węglowodorów Hydrocarbon uptake [%]	Czas retencji Retention time [min]	Powierzchnia piku Peak area	Zużycie węglowodorów Hydrocarbon uptake [%]
<i>Gordonia alkanivorans</i> S7						
Undekan	15,1	956700	65	15,1	799534	46
Dodekan	18,6	766003	66	18,6	712886	43
Tridekan	21,9	1318140	63	21,9	1175579	40
Tetradekan	25,0	1490681	64	25,0	1317810	42
Pentadekan	28,0	1545087	68	28,0	1473249	44
Heksadekan	30,9	1777100	68	30,8	1726795	44
Heptadekan	33,6	1827328	57	33,5	1645283	29
Oktadekan	36,1	1886636	66	36,1	1650648	46
Nonadekan	38,6	1736969	66	38,6	1434101	48
Ejkozan	41,0	1640698	66	40,9	1260231	52
Henejkozan	43,2	1199608	66	43,1	852687	56
Dokozaan	45,3	890409	66	45,3	571736	61
Trikozaan	47,4	542950	68	47,3	444331	52
Tetrakozaan	49,4	254336	68	49,3	213523	51
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SL3						
Undekan	15,1	1116909	29	15,0	889699	31
Dodekan	18,6	974544	26	18,5	964104	10
Tridekan	21,9	1530880	26	21,8	1179344	30
Tetradekan	25,0	1691264	29	25,0	1353343	30
Pentadekan	28,0	1801905	36	27,9	1461946	36
Heksadekan	30,9	2095943	35	30,8	1669764	37
Heptadekan	33,6	2145342	13	33,5	1727304	13
Oktadekan	26,1	2144893	33	36,1	1780979	32
Nonadekan	38,6	1810117	38	38,5	1614929	32
Ejkozan	40,9	1597956	42	41,0	1452917	35
Henejkozan	43,2	1200645	41	43,1	1104843	34
Dokozaan	45,3	840166	45	45,2	819331	34
Trikozaan	47,4	516746	47	47,3	509694	35
Tetrakozaan	49,4	230846	50	49,3	241531	35

PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki wskazują, jak ważną jest kontrola stężenia jonów metali, w tym żelaza, przed rozpoczęciem procesu remediacji zanieczyszczonego węglowodorami środowiska. Stężenie jonów żelaza może mieć duży wpływ na rozwój drobnoustrojów, produkcję biosurfaktantów i aktywność degradacyjną szczepów. Obecność jonów żelaza w podłożu w

stężeniach 1–7 mg Fe/dm³ korzystnie wpływa na proces biodegradacji prowadzonej z udziałem szczepów *G. alkanivorans* S7 i *P. fluorescens* SL3. Dawki jonów żelaza powyżej 15 mg Fe/dm³ wpływają niekorzystnie na efektywność biodegradacji. Dalszy wzrost stężenia jonów żelaza do 50 mg/dm³ powoduje wyraźne obniżenie zużycia węglowodorów (o 14 jednostek procentowych); dla dawki jonów żelaza 100 mg/dm³ spadek ten wynosi 25 jednostek procentowych. Badane szczepy bakterii posiadają zdolność kumulowania jonów żelaza wewnątrz komórki. W przypadku szczepu *G. alkanivorans* S7, hodowanego w obecności 15 mg Fe/dm³ niemal 80% puli jonów żelaza odnaleziono w biomacie, jedynie około 20% pozostawało w płynie hodowlanym.

LITERATURA

- [1] Bradford M.: *A rapid and sensitive method for the quantition of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding*, Anal. Biochem., **72**, 248–254, (1976)
- [2] Chmiel A.: *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa 1998.
- [3] Crawford R.L., D.L. Crawford: *Bioremediation: Principles and Applications*, Cambridge University Press, 12–27, 74–75, 324–325 (1996).
- [4] Dinkla I.T.J., E.M. Gabor, D.B. Janssen: *Effects of Iron Limitation on Degradation of Toluene by Pseudomonas Strains Carrying the TOL (pww0) Plasmid*. Appl. Environ. Microbiol., **8**, 3406–3412 (2001).
- [5] Galas E., E. Kwapisz, W. Majchrzak, J. Polak: *Skrining drobnoustrojów degradujących cięższe frakcje ropy naftowej*, Materiały VII Sympozjum „Biotechnologia Środowiskowa”, Wisła, 75–86 (1998).
- [6] Margesin R., F. Schinner: *Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **56**, 650–663, (2001).
- [7] Stróżycki P.M.: *Żelazo – pierwiastek życia i śmierci*, Biotechnologia, **3**(46), 45–5 (1999).
- [8] Zyska B.: *Mikrobiologiczna korozja materiałów*, WNT, Warszawa 1977.

Wpłynęło: 24 lutego 2003, zaakceptowano do druku: 7 lipca 2003.