

MARTA WOŹNIAK<sup>1</sup>, ROMAN MARECIK<sup>2</sup>, ŁUKASZ ŁAWNICZAK<sup>1</sup>, ŁUKASZ CHRZANOWSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Technologii i Inżynierii Chemicznej  
Politechnika Poznańska

<sup>2</sup>Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## RAMNOLIPIDY JAKO AKTYWNA OCHRONA MIKROORGANIZMÓW PRZED TOKSYNAMI

RAMNOLIPIDS AS ACTIVE PROTECTIVE AGENTS FOR MICROORGANISMS  
AGAINST TOXIC SUBSTANCES

**Streszczenie.** Obecność biosurfaktantów pochodzenia mikrobiologicznego zmniejsza toksyczność chlorofenoli względem komórek *Pseudomonas putida* 2A. Micele powstałe z ramnolipidów wybiórczo zamykały chlorofenole i czyniły je mniej dostępnymi dla mikroorganizmów, co powodowało spadek toksyczności chlorofenoli względem komórek bakteryjnych. Zaobserwowano wzrost efektywnego stężenia ksenobiotyku powodującego 50-procentową inhibicję wzrostu mikroorganizmów (o 0,5, 0,35 oraz 0,15 mmol odpowiednio dla fenolu, 4-chlorofenolu i 2,4-dichlorofenolu). Zastosowanie surfaktantów jako środków chroniących mikroorganizmy otwiera nowe możliwości wykorzystania tego zjawiska w technikach bioremediacyjnych.

**Słowa kluczowe:** chlorofenole, micele, *Pseudomonas putida*, ramnolipidy, toksyczność

### Wstęp

Unikatową właściwością związków powierzchniowo czynnych jest zdolność do tworzenia micel przy stężeniu zwanym krytycznym stężeniem micelizacji (CMC). Amfifilowe cząsteczki surfaktantów orientują się w roztworach wodnych, tworząc micele, które posiadają hydrofobowy rdzeń, natomiast ich powierzchnia jest zbudowana z hydrofilowych fragmentów surfaktantów. Z praktycznego punktu widzenia możliwe jest wykorzystanie micel do zwiększenia rozpuszczalności w wodzie związków hydrofobowych, takich jak węglowodory, pestycydy itp. (AVRAMOVA i IN. 2008, WANG i KELLER 2008, NAYAK i IN. 2009). Może to prowadzić do zwiększonej dostępności dla mikroorganizmów substancji solubilizowanych, co często się stosuje w technikach bioremedia-

cyjnych. Takie funkcjonowanie micel stało się niejako powszechnym założeniem, nie-poddawanym dyskusji. Ostatnimi czasy pojawiają się jednak doniesienia mówiące o przypadkach, w których obecne w hydrofobowym rdzeniu substancje są niedostępne dla mikroorganizmów. Przykładowo zaobserwowano, że obecność surfaktantów pochodzenia mikrobiologicznego zmniejsza toksyczność chlorofenoli względem wzorcowych komórek *Pseudomonas putida* DOT-T1E (CHRZANOWSKI i IN. 2009). Takie funkcjonowanie micel, które wybiórczo zamykały związki hydrofobowe i czyniły je niedostępnymi dla mikroorganizmów, otwiera nowe możliwości wykorzystania tego zjawiska w technikach bioremediacyjnych. Kluczowa wydaje się nam konieczność zweryfikowania uzyskanych wyników z wykorzystaniem szczepu *Pseudomonas putida* 2A wyizolowanego, ze środowiska glebowego skażonego ropą naftową.

## Material i metody

### Mikroorganizmy i odczynniki

W badaniach użyto bakterii *Pseudomonas putida* 2A wyizolowanych z gleby skażonej ropą naftową z okolicy Gorlic. Identyfikacji dokonano za pomocą 16S rRNA. Są to typowe bakterie Gram-ujemne, powszechnie występujące w środowisku wodnym i glebowym. Szczep zastosowany w badaniach nie był zdolny do wykorzystania fenoli ani chlorofenoli jako źródła węgla. Wszystkie zastosowane odczynniki pochodziły ze źródeł komercyjnych i charakteryzowały się najwyższym dostępnym na rynku stopniem czystości.

Ramnolipidy użyte w badaniach to komercyjny 25-procentowy wodny roztwór biosurfaktantów (JBR-425), wyprodukowany przez Jeneil Biosurfactant Company, Saukville, WI, USA. W jego skład wchodzi mieszanina ramnolipidów: RL1 (L-ramnozylo- $\beta$ -hydroksydekanoilo- $\beta$ -hydroksydekanian) oraz RL2 (L-ramnozylo-L-ramnozylo- $\beta$ -hydroksydekanoilo- $\beta$ -hydroksydekanian). Oba składniki są anionowymi związkami powierzchniowo czynnymi produkowanymi przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Wartość krytycznego stężenia micelizacji (CMC) tej mieszaniny mieściła się w przedziale 100-150 mg/dm<sup>3</sup>.

### Warunki hodowli

Hodowle *Pseudomonas putida* 2A prowadzono na pożywce mineralnej o pH 7, zgodnie z procedurą podaną przez HARTMANSA i IN. (1989). Jako źródła węgla stosowano bursztynian sodu o stężeniu 4 g/dm<sup>3</sup>. Hodowle prowadzono w temperaturze 30°C w butelkach szklanych o pojemności 250 ml, do których wprowadzono 50 ml przygotowanej pożywki mineralnej. Hodowle umieszczono w wyrząsarce z łaźnią wodną o rotacji 180 obr/min. Wzrost mikroorganizmów był monitorowany poprzez pomiar gęstości optycznej (1 ml co godzinę) za pomocą spektrofotometru UV-Vis Shimadzu 1601PC, Japonia.

### Wyznaczanie EC<sub>50</sub>

Toksyczność fenoli obliczano na podstawie EC<sub>50</sub> (ang. *Effective Concentration* – efektywne stężenie), czyli stężenia substancji toksycznej wywołującego 50-procentowe zahamowanie wzrostu mikroorganizmów. Zahamowanie wzrostu wyznaczono przez porównanie różnic w tempie wzrostu  $\mu$  (h<sup>-1</sup>) bakterii, do których wprowadzono odpowiednio fenole/chlorofenole ( $\mu_{1,\text{tok}}$ ), z próbkami kontrolnymi ( $\mu_{0,\text{kon}}$ ).

$$\text{zahamowanie wzrostu (\%)} = \frac{\mu_{1,\text{tok}}}{\mu_{1,\text{kon}}} \cdot 100$$

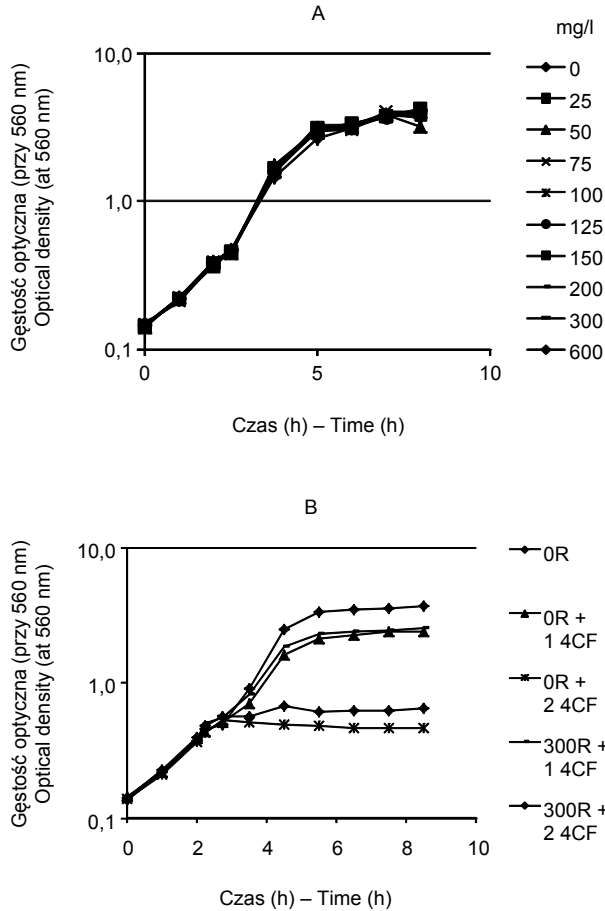
### Wyznaczenie krytycznego stężenia micelizacji (CMC) ramnolipidów oraz fizyczno-chemiczne właściwości powierzchniowe komórek

Krytyczne stężenie micelizacji mieszaniny ramnolipidów określano, stosując standardowe procedury wykonywania pomiarów napięcia powierzchniowego w zakresie różnych stężeń ramnolipidów: od 0,1 do 1000 mg/dm<sup>3</sup>, opisane przez PATISTA i IN. (2000). Stopień hydrofobowości, niezwilżalności powierzchni komórek bakteryjnych otrzymano na podstawie pomiaru wartości statycznego kąta zwilżania ( $\theta_c$ ) małych kropeł wody umieszczonych na filtrze pokrytym warstwą bakterii. Pomiar kąta zwilżania, czyli kąta utworzonego między płaską powierzchnią ciała stałego a powierzchnią styczną do powierzchni cieczy graniczącą z tym ciałem stałym, wykonano goniometrem (Krüss GmbH, Niemcy). Kąty zwilżania były mierzone przynajmniej dla 10 kropeł 1-mikrolitrowych.

### Wyniki i dyskusja

Monitorowanie wzrostu mikroorganizmów, gdy jako źródło węgla stosowano bursztynian disodowy, jednoznacznie wykazało, że zastosowany biosurfaktant nie był wykorzystywany przez bakterie *Pseudomonas putida* 2A jako źródło węgla i energii. Nie zaobserwowano również negatywnego wpływu ramnolipidów na rozwój mikroorganizmów. Krzywe wzrostu uzyskane dla prób zawierających ramnolipidy w przedziale stężeń 25-600 mg/l pokrywały się z przebiegiem krzywej uzyskanej dla próby odniesienia nie zawierającej ramnolipidów (rys. 1 A).

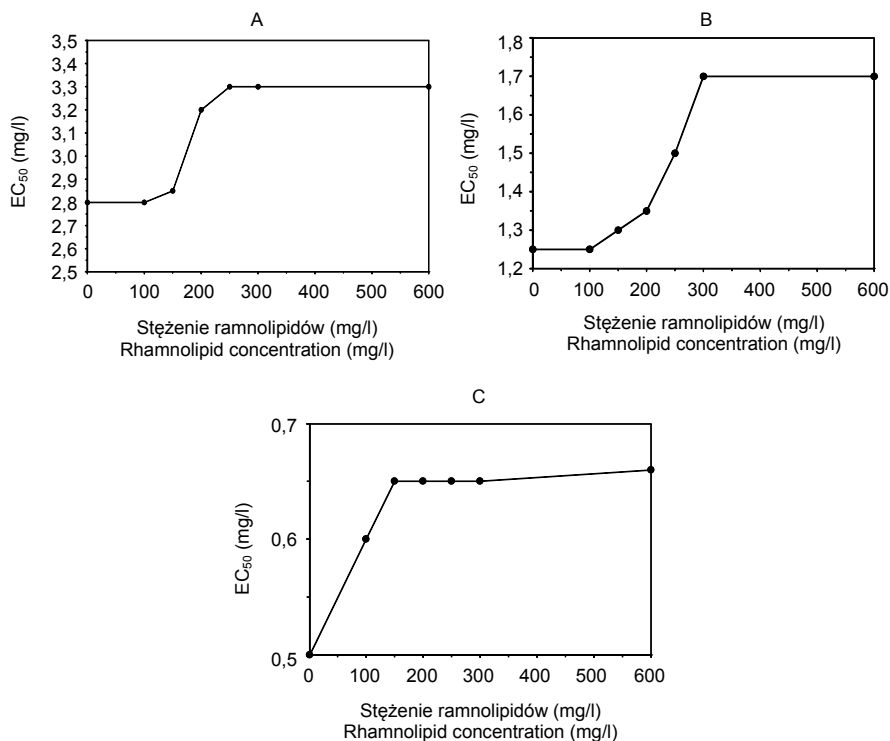
Pomiary gęstości optycznej przeprowadzone dla układów, gdzie obecne były chlorofenole, potwierdziły pozytywny wpływ ramnolipidów na wzrost mikroorganizmów w obecności toksycznych związków. Przykładowe zestawienie krzywych uzyskanych dla próbek zawierających 4-chlorofenol (stężenie 0, 1 oraz 2 mmol) oraz ramnolipidy (300 mg/l) przedstawiono na rysunku 1 B. Dla układów zawierających wyłącznie 4-chlorofenol odnotowano mniejszą wartość gęstości optycznej w porównaniu do próbkami zawierającymi dodatek ramnolipidów. Wskazuje to jednoznacznie na zmniejszenie toksyczności chlorofenolu w obecności ramnolipidów.



Rys. 1. Krzywe wzrostu mikroorganizmów: A – dla próbek zawierających ramnolipidy w przedziale 25-600 mg/l, B – dla próbek zawierających 1 lub 2 mmol 4-chlorofenolu (1 4CF i 2 4CF) oraz 0 lub 300 mg/l ramnolipidów (0R i 300R)

Fig. 1. Microbial growth curves: A – for samples containing rhamnolipids in range 25-600 mg/l, B – for samples containing 1 or 2 mmol of 4-chlorophenol (1 4CF and 2 4CF) and 0 or 300 mg/l of rhamnolipids (0R and 300R)

Przeprowadzono badania nad redukcją toksyczności dla fenolu, 4-chlorofenolu i 2,4-dichlorofenolu w całym analizowanym zakresie stężeń ramnolipidów (25-600 mg/l) celem wyznaczenia minimalnego stężenia biosurfaktantów powodującego znaczącą redukcję wartości  $EC_{50}$ . Zestawienie uzyskanych rezultatów przedstawiono na rysunku 2.

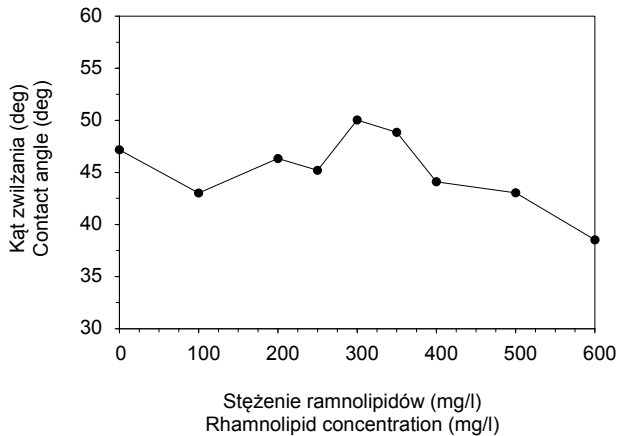


Rys. 2. Wpływ stężenia ramnolipidów na redukcję wartości EC<sub>50</sub> dla: A – fenolu, B – 4-chlorofenolu, C – 2,4-dichlorofenolu

Fig. 2. Influence of rhamnolipid concentration on the reduction of EC<sub>50</sub> value for: A – phenol, B – 4-chlorophenol, C – 2,4-dichlorophenol

Dla fenolu minimalne stężenie ramnolipidów powodujące maksymalną redukcję wartości EC<sub>50</sub> wynosiło 250 mg/l (rys. 2 A). Jednocześnie warto odnotować, że wyjściowa wartość EC<sub>50</sub> dla fenolu była największa (2,8 mmol), co przekłada się na najmniejszą toksyczność wśród badanych związków. W obecności biosurfaktantów ilość związku powodująca 50% inhibicji wzrostu mikroorganizmów wzrosła do 3,3 mmol. Dla 4-chlorofenolu wyjściowa wartość EC<sub>50</sub> była ponad dwa razy mniejsza (1,25 mmol), a największa redukcja toksyczności nastąpiła po dodaniu ramnolipidów w ilości 300 mg/l – wartość EC<sub>50</sub> wzrosła do 1,7 mmol (rys. 2 B). Dla 2,4-dichlorofenolu, który okazał się najbardziej toksyczny spośród badanych związków (EC<sub>50</sub> = 0,5 mmol), maksymalna redukcja toksyczności nastąpiła już przy 150 mg/l, powodując wzrost wartości EC<sub>50</sub> do 0,65 mmol (rys. 2 C).

Przebadano zmiany wartości kąta zwilżania dla komórek *Pseudomonas putida* 2A w zależności od ilości dodanych ramnolipidów (100-600 mg/l). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 3. Dodatek biosurfaktantów powodował nieznaczne zmiany wyjściowej wartości kąta zwilżania (47 deg). Największą wartość kąta zwilżania (około 50 deg) odnotowano dla stężenia ramnolipidów wynoszącego 300 mg/l, natomiast najmniejszą



Rys. 3. Zmiany wartości kąta zwilżania dla komórek *Pseudomonas putida* 2A w zależności od stężenia ramnolipidów  
 Fig. 3. Shifts in contact angle value for *Pseudomonas putida* 2A cells depending on the rhamnolipid concentration

(39 deg) – dla stężenia ramnolipidów wynoszącego 600 mg/l. Stosunkowo niewielkie zmiany spowodowane obecnością surfaktantów mogą świadczyć o przewadze interakcji pomiędzy biosurfaktantami a toksycznymi substancjami nad potencjalnymi interakcjami pomiędzy biosurfaktantami a strukturami membran komórkowych bakterii *Pseudomonas putida* 2A, które mogłyby skutkować zmianą właściwości powierzchniowych.

Powszechnie uważa się, że zwiększenie rozpuszczalności węglowodorów ropopochodnych przez ramnolipidy często odbywa się na zasadzie tworzenia micel, co pozytywnie wpływa na efektywność procesów biodegradacyjnych (SOUTHAM i IN. 2001, GHAZALI i IN. 2004). Jednak z drugiej strony stosowanie surfaktantów do intensyfikacji procesów bioremediacyjnych może sprawiać, że rozpuszczalność związków toksycznych w wodzie może ulegać zwiększeniu (VERMUË i IN. 1993, CHAVAN i MUKHERJI 2010). Ścieki bogate w węglowodory zawierają zwykle wiele związków o toksycznych właściwościach (BOTALOVA i IN. 2009). W rezultacie może to prowadzić do inhibicji wzrostu mikroorganizmów i zmniejszenia efektywności biodegradacji, co znacznie ogranicza aplikacje metod opartych na działaniu surfaktantów. Redukcja toksyczności w drodze ograniczenia biodostępności pozwoli na rozwiązanie tego problemu, zatem celowe wydaje się prowadzenie badań zakresie tej tematyki.

Istotna redukcja wartości  $EC_{50}$  dla pochodnych fenolu w obecności ramnolipidów wskazuje na ograniczenie biodostępności toksycznych związków dla bakterii, co przekłada się na znaczne zmniejszenie stężenia toksyn w roztworze wodnym. Efekt ten był najbardziej widoczny, kiedy zastosowano ramnolipidy przy stężeniu odpowiadającym wartości CMC. Powyżej tego stężenia następuje równowagowy podział fenoli pomiędzy micelle i fazę wodną, co w konsekwencji prowadzi do redukcji ilości wolnych toksyn i znacznego wzrostu wartości  $EC_{50}$ .

Poprzednie badania wykonane dla szczepu *Pseudomonas putida* DOT-T1E (CHRZANOWSKI i IN. 2009) oraz konsorcjum środowiskowego (CHRZANOWSKI i IN. 2011)

wskazują, że zamykanie toksycznych substancji w rdzeniu micel tworzonych przez biosurfaktanty może znacznie zwiększyć przyrost biomasy bakteryjnej, co w konsekwencji będzie wpływać na zwiększenie efektywności biodegradacji. Rezultaty otrzymane w ramach niniejszej pracy dla *Pseudomonas putida* 2A potwierdzają, że strategia ta może być wykorzystana również dla innych szczepów. Przyszłe badania powinny zweryfikować możliwość wykorzystania biosurfaktantów jako środka redukującego toksyczność dla innych toksycznych związków występujących w ściekach bogatych w węglowodory.

## Literatura

- AVRAMOVA T., SOTIROVA A., GALABOVA D., KARPENKO E., 2008. Effect of Triton X-100 and rhamnolipid PS-17 on the mineralization of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. cells. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62: 415-420.
- BOTALOVA O., SCHWARZBAUER J., FRAUENRATH T., DSIKOWITZKY L., 2009. Identification and chemical characterization of specific organic constituents of petrochemical effluents. *Water Res.* 43: 3797-3812.
- CHAVAN A., MUKHERJI S., 2010. Effect of co-contaminant phenol on performance of a laboratory-scale RBC with algal-bacterial biofilm treating petroleum hydrocarbon rich wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85: 851-859.
- CHRZANOWSKI Ł., OWSIANIAK M., SZULC A., MARECIK R., PIOTROWSKA-CYPLIK A., OLEJNIK-SCHMIDT A.K., STANIEWSKI J., LISIECKI P., CIESIELCZYK F., JESIONOWSKI T., HEIPIEPER H.J., 2011. Interactions between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of a model hydrocarbon-rich effluent. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65: 605-611.
- CHRZANOWSKI Ł., WICK L.Y., MEULENKAMP R., KAESTNER M., HEIPIEPER H.J., 2009. Rhamnolipid biosurfactants decrease the toxicity of chlorinated phenols to *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 756-762.
- GHAZALI F.M., RAHMAN R.N.Z.A., SALLEH A.B., BASRI M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 54: 61-67.
- HARTMANS S., SMITS J.P., VAN DER WERF M.J., VOLKERING F., DE BONT J.A.M., 1989. Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in the styrene-degrading *Xanthobacter* strain 124X. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 11: 2850-2855.
- NAYAK A.S., VIJAYKUMAR M.H., KAREGOUDAR T.B., 2009. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp PNK-04 and its application in bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63: 73-79.
- PATIST A., BHAGWAT S.S., PENFIELD K.W., AIKENS P., SHAH D.O., 2000. On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants. *J. Surfactants Deterg.* 3: 55-58.
- SOUTHAM G., WHITNEY M., KNICKERBOCKER C., 2001. Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria oil interface: implications for bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 47: 197-201.
- VERMUË M., SIKKEMA J., VERHEUL A., BAKKER R., TRAMPER J., 1993. Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 747-758.
- WANG P., KELLER A.A., 2008. Partitioning of hydrophobic organic compounds within soil-water-surfactant systems. *Water Res.* 42: 2093-2101.

## RHAMNOLIPIDS AS ACTIVE PROTECTIVE AGENTS FOR MICROORGANISMS AGAINST TOXIC SUBSTANCES

**Summary.** The presence of microbial biosurfactants decreases the toxicity of chlorophenols towards *Pseudomonas putida* 2A cells. The rhamnolipid-originating micelles selectively entrapped chlorophenol molecules, which resulted in their lower bioavailability to microbial cells. It was observed that the effective concentrations causing 50% growth inhibition increased by 0.5, 0.35 and 0.15 for phenol, 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol, accordingly. The application of surfactants as protective agents for microorganisms brings about new possibilities of using this phenomenon in bioremediation techniques.

**Key words:** chlorophenols, micelles, *Pseudomonas putida*, rhamnolipids, toxicity

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

Roman Marecik, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Poland, e-mail: romarc@up.poznan.pl

*Zaakceptowano do druku – Accepted for print:*

11.07.2012

*Do cytowania – For citation:*

Woźniak M., Marecik R., Ławniczak Ł., Chrzanowski Ł., 2012. Rhamnolipidy jako aktywna ochrona mikroorganizmów przed toksynami. *Nauka Przyr. Technol.* 6, 4, #77.