POLITECHNIKA POZNAŃSKA
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ

ROZPRAWA DOKTORSKA

WPŁYW ZANIECZYSZCZEŃ WĘGLOWODOROWYCH NA ZDOLNOŚCI ADAPTACYJNE MIKROORGANIZMÓW DO BIODEGRADACJI ZWIĄZKÓW ALIFATYCZNYCH I AROMATYCZNYCH

mgr inż. AGATA JOANNA ZDARTA

Praca doktorska wykonana w ramach
Studium Doktoranckiego i przedłożona
Radzie Wydziału Technologii Chemicznej
Politechniki Poznańskiej
w celu uzyskania stopnia doktora

Promotor: dr hab. inż. Ewa Kaczorek, prof. nadzw.

Poznań 2019

Składam wyrazy wdzięczności

Pani dr hab. inż. Ewie Kaczorek, prof. nadzw.

za życzliwość, opiekę oraz liczne rozmowy i wskazówki

będące pomocą podczas badań i tworzenia tej pracy

Dziękuję

Doktorantom i Pracownikom Zakładu Chemii Organicznej

oraz Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej

za cenne uwagi i pomoc okazywane każdego dnia

Szczególne wyrazy podziękowania pragnę skierować

do dr inż. Wojciecha Smułka,

za owocną współpracę oraz godziny dyskusji,

dzięki którym rozwinęłam moją pracę

Niniejszą pracę dedykuję mojemu Mężowi,
na którego wsparcie zawsze mogłam liczyć,
który motywował mnie do jeszcze cięższej pracy
i bez którego pomocy ta praca by nie powstała

Spis treści

SPIS SKRÓTÓW I SYMBOLI 8

WPROWADZENIE 10

PRZEGLĄD LITERATURY 11

1. ZANIECZYSZCZENIA ŚRODOWISKOWE 11

1.1. Rodzaje i źródła zanieczyszczeń węglowodorowych 11

1.2. Normy oraz dopuszczalne poziomy związków węglowodorowych w środowisku, w Polsce i na świecie 14

1.3. Metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych 16

2. MIKROORGANIZMY W USUWANIU ZANIECZYSZCZEŃ 17

2.1. Budowa i właściwości mikroorganizmów 18

2.2. Cechy warunkujące efektywny transport i metabolizm zanieczyszczeń węglowodorowych 19

2.3. Bioaugmentacja i jej wykorzystanie w remediacji zanieczyszczeń 23

3. WPŁYW WĘGLOWODORÓW ALIFATYCZNYCH I AROMATYCZNYCH NA KOMÓRKI MIKROORGANIZMÓW 27

3.1. Stres metaboliczny i odpowiedź komórkowa 27

3.2. Szlaki degradacji węglowodorów aromatycznych i alifatycznych 30

3.3. Modyfikacje właściwości komórek pod wpływem węglowodorów 33

CEL I ZAKRES PRACY 42

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA 43

1. ODCZYNNIKI I APARATURA 43

2. PRZYGOTOWANIE SZKŁA I ROZTWORÓW DO BADAŃ 45

2.1. Sterylizacja 45

2.2. Przygotowanie wody 46

2.3. Medium hodowlane i suplementy do powadzenia hodowli 46

3. IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW BAKTERYJNYCH 48

3.1. Izolacja mikroorganizmów 48

3.2. Charakterystyka wody jeziornej 50

3.3. Określenie profilu biochemicznego mikroorganizmów 51

3.4. Identyfikacja genetyczna mikroorganizmów 52

3.5. Ekspozycja komórek na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy 52

4. ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNIOWYCH MIKROORGANIZMÓW 54
4.1. Przygotowanie komórek do analiz *54*
4.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa *54*
4.3. Mikrobiologiczna adhezja do węglowodorów *54*
4.4. Potencjał elektrokinetyczny i rozkład wielkości cząstek *55*
4.5. Przepuszczalność błon komórkowych *55*
4.6. Aktywność enzymatyczna *57*
5. SZCZEGÓŁOWA ANALIZA ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK EKSPONOWANYCH NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE 58
5.1. Profil błonowych kwasów tłuszczowych *58*
5.2. Profile białkowe mikroorganizmów *59*
5.3. Analiza losowych amplifikacji polimorficznego DNA (PCR-RAPD) *62*
6. ANALIZY CHROMATOGRAFICZNE 63
6.1. Hodowle do testów biodegradacji *63*
6.2. Przygotowanie prób chromatograficznych *64*
6.3. Analiza chromatograficzna *64*
7. ANALIZA METAGENOMOWA 64
8. ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW 65
WYNIKI BADAŃ, ICH ANALIZA I DYSKUSJA 66
1. IZOLACJA I SELEKCJA MIKROORGANIZMÓW 66
2. EKSPOZYCJA NA WĘGLOWODORY I JEJ WPŁYW NA WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK 71
2.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa *71*
2.2. Mikrobiologiczna adhezja do węglowodorów *74*
2.3. Potencjał elektrokinetyczny komórek *76*
2.4. Rozkład wielkości cząstek *77*
2.5. Przepuszczalność błon komórkowych *79*
2.6. Aktywność wybranych białek enzymatycznych *80*
2.7. Dyskusja wyników *82*
3. SZCZEGÓŁOWA ANALIZA ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK EKSPONOWANYCH NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE 90
3.1. Analiza porównawcza profili błonowych kwasów tłuszczowych *91*
3.2. Modyfikacje profilu białkowego komórek *93*
3.3. Analiza losowych amplifikacji polimorficznego DNA (PCR-RAPD) *99*

3.4. Dyskusja wyników ... *101*

4. PORÓWNANIE ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI BIODEGRADACYJNYCH KOMÓREK EKSPONOWANYCH I NIEEKSPONOWANYCH NA WĘGLOWODORY ... 107

4.1. Biodegradacja węglowodórów przez bakterie nieeksponowane ... *108*

4.2. Biodegradacja węglowodorów przez bakterie eksponowane na węglowodory aromatyczne ... *110*

4.3. Biodegradacja węglowodorów przez bakterie eksponowane na węglowodory alifatyczne ... *113*

4.4. Biodegradacja węglowodorów przez bakterie eksponowane na olej napędowy ... *115*

4.5. Dyskusja wyników ... *117*

5. OCENA MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA UZYSKANYCH SZCZEPÓW W USUWANIU ZANIECZYSZCZEŃ WĘGLOWODOROWYCH Z PRÓBEK WODNYCH ... 119

5.1. Biodegradacja oleju napędowego ... *119*

5.2. Analiza metagenomu ... *122*

5.3. Dyskusja wyników ... *127*

PODSUMOWANIE ... **130**

BIBLIOGRAFIA ... **136**

SPIS TABEL I RYSUNKÓW ... **158**

DOROBEK NAUKOWY AUTORA ... **162**

STRESZCZENIE ... **169**

ABSTRACT ... **171**

ANEKS ... **173**

SPIS SKRÓTÓW I SYMBOLI

1,2 – DO – 1,2-dioksygenaza katecholowa

2,3 – DO – 2,3-dioksygenaza katecholowa

acetylo-CoA – acetylokoenzym A, reszta kwasu octowego związana tioestrowo z koenzymem A

ATP – adenozyno-5′-trifosforan

BCA – metoda ilościowego oznaczania białek z kwasem bis-cynchoninowym

BTEX – mieszanina benzen, toluen, etylobenzen, ksylen

CDNB – 1-chloro-2,4-dinitrobenzen

CTAB – bromek heksadecylotrimetyloamoniowy

CSH – hydrofobowość powierzchni komórek, ang. *cell surface hydrophobicity*

DTT – ditiotreitol

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

dNTP – mieszanina deoksynukleotydów, w skład mieszaniny wchodzą nukleotydy: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (adenina, cytozyna, guanina, tymina) wymieszane w równych proporcjach

EDTA – kwas wersenowy, kwas etylenodiaminotetraoctowy

EPS – egzopolimery ang. *extracellular polymeric substances*

ER – retikulum endoplazmatyczne

GC – chromatografia gazowa

GRP – białka opiekuńcze regulowane przez glukozę, ang. *glucose regulated proteins*

GST – transferaza glutationowa, ang. *glutatione S-transferaze*

HMN – 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-heptametylononan

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

IAA – jodoacetamid

LPS – lipopolisacharydy błonowe

MSM – medium hodowlane, ang. *mineral salts medium*

NAPL – ciekłe węglowodory nierozpuszczalne w wodzie ang. *non-aqueous phase liquids*

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ONP – *orto*-nitrofenol

ONPG – *orto*-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd

OMV – pęcherzyki błonowe, ang. *outer membrane vesicles*

PdI – indeks polidyspersyjności, ang. *polidispesity index*

RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz

SEM – skaningowy mikroskop elektronowy

TCA – cykl kwasu cytrynowego, ang. *tricarboxylic acid cycle*

TEM – transmisyjny mikroskop elektronowy

UE – Unia Europejska

UPR – akumulacja niesfałdowanych białek, ang. *unfolded protein response*

WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

VBNC – strategia adaptacyjna bakterii polegająca na obniżeniu aktywności fizjologicznej i metabolicznej komórki oraz utracie zdolności do wzrostu na podłożu hodowlanym, ang. *viable but nonculturable*

WPROWADZENIE

Ochrona zdrowia i życia ludzi jest najważniejszym wyzwaniem stojącym przed współczesną gospodarką i polityką. Zaspokojenie rosnącym potrzeb konsumentów i jednoczesne zapewnienie najlepszych warunków rozwoju dla przyszłych generacji może być zagwarantowane poprzez zrównoważony rozwój, minimalizację ingerencji ludzi w otoczenie oraz rozwój społeczny. Wszystkie te obszary łączy konieczność troski o środowisko, które jest miejscem bytowania i rozwoju ludzi, a które często ulega skażeniu w wyniku rozległej działalności przemysłowej. Zanieczyszczeniami budzącymi szczególne zaniepokojenie są węglowodory ropopochodne, charakteryzujące się wysoką toksycznością oraz niską degradowalnością.

Wykorzystywane obecnie najczęściej fizykochemiczne metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych prowadzą do ich przekształcenia lub przeniesienia części skażonego materiału w odpowiednio zabezpieczone miejsce składowania. Związany jest z tym problem dalszej przeróbki szkodliwych związków oraz wyskie koszty prowadzenia procesu. Obiecującą alternatywą jest bioremediacja, wykorzystująca zdolności mikroorganizmów do rozkładu ksenobiotyków. Największym wyzwaniem w rozwoju metod bioremiediacji środowiska jest dobór mikroorganizmów mogących usuwać zanieczyszczenia węglowodorowe w szerokim spektrum warunków środowiskowych. Wykorzystywane w metodach biologicznych bakterie powinny spełniać szereg wymogów oraz charakteryzować się dużymi zdolnościami biodegradacyjnymi, pozwalającymi na usunięcie zanieczyszczeń w możliwie krótkim czasie. Bardzo istotne jest również zapewnienie bezpieczeństwa stosowanych preparatów i ich możliwie małego wpływu na mikroorganizmy naturalnie występujące w danym śroeodiwsku. Wszystkie te wymagania i regulacje sprawiają, że w literaturze opisywanych jest wiele przykładów wykorzystania bakterii należących do różnych rodzajów i pochodzących z różnorodnych terenów, jednak do tej pory nie udało się zidentyfikować cech charakteryzujących mikroorganizmy „idealne" do prowadzenia procesów usuwania zanieczyszczeń. Rozwiązaniem może być indukowanie zmian powierzchniowych i metabolicznych poprawiających właściwości degradacyjne bakterii.

PRZEGLĄD LITERATURY

1. Zanieczyszczenia środowiskowe

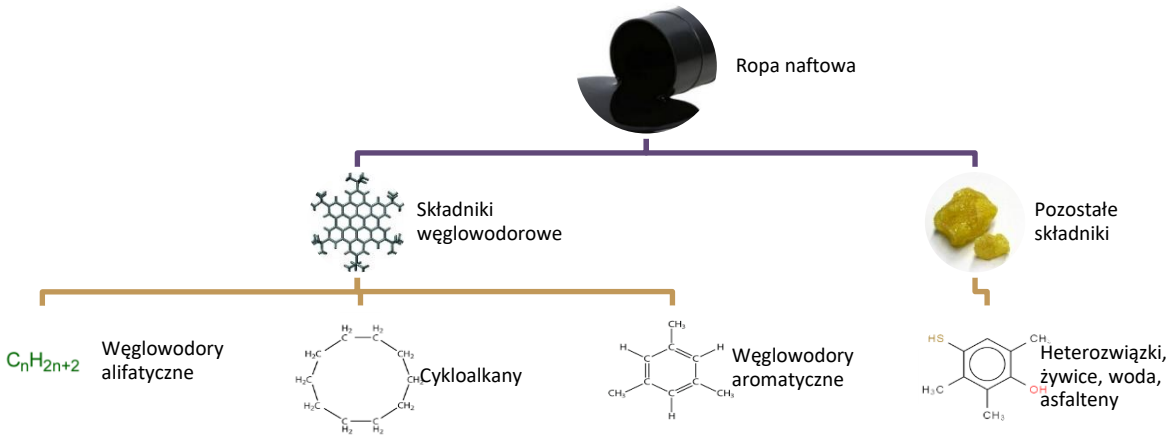
Rozwój miast i infrastruktury skutkujący coraz większą ingerencją człowieka w środowisko naturalne, powoduje wzrost zagrożenia przedostania się substancji niepożądanych do wód oraz gleby. Zanieczyszczenie środowiskowe definiowane jest jako wzrost poziomu danej substancji w środowisku powyżej poziomu naturalnego występowania, uniemożliwiający normalne funkcjonowanie składników fizycznych i biologicznych ekosystemu. Jest to jeden z najpoważniejszych globalnych problemów ludzkości, mogących mieć długotrwałe negatywne skutki dla środowiska naturalnego oraz organizmów żywych [1].

1.1. Rodzaje i źródła zanieczyszczeń węglowodorowych

Występujące w środowisku zanieczyszczenia najczęściej mają pochodzenie antropogeniczne i są związkami dostającymi się do gleby, wody i powietrza w wyniku, transportu, użytkowania i przekształcania przez człowieka różnorodnych substancji. Źródłem zanieczyszczeń w środowisku są m. in. substancje ropopochodne stanowiące ważny zasób energii i substratów dla wielu gałęzi przemysłu [2]. Związki ropopochodne dostające się do środowiska stanowią poważne zagrożenie dla fauny, flory oraz ludzi ze względu na ich wysoką toksyczność, mutagenność, zakłócanie wzrostu i rozmnażania zwierząt oraz wpływ na zmniejszenie zdolności fotosyntetycznych roślin i generowanie gazów cieplarnianych [3–5].

Węglowodory wchodzące w skład ropy naftowej podzielić można na trzy główne klasy: węglowodory alifatyczne, cykloalkany oraz węglowodory aromatyczne (mono- i wielopierścieniowe) [6]. Struktury wybranych przedstawicieli wspomnianych klas przedstawiono na Rysunku I. 1.

Węglowodory alifatyczne występujące w ropie naftowej charakteryzują się zróżnicowaną długością łancucha węglowego oraz masą molową. Mikroorganizmy najczęściej są zdolne do degradacji węglowodorów alifatycznych o długości łańcucha nie przekraczajacej 30 atomów węgla w cząsteczce, znane są jednak bakterie utylizujące związki 44-węglowe [7,8].



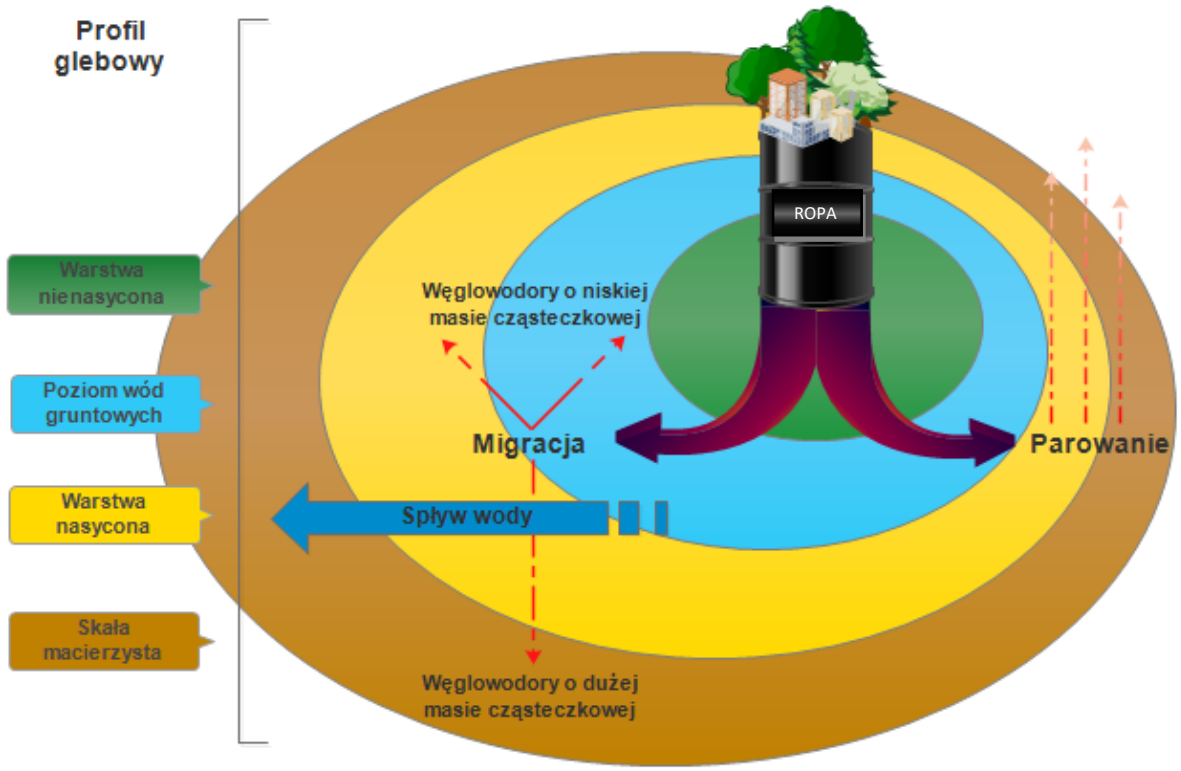
Rysunek I. 1. Schemat podziału węglowodorów wchodzących w skład ropy naftowej (na podstawie [7-11])

Źródłem zanieczyszczeń węglowodorami alifatycznymi dostającymi się do środowiska jest najczęściej eksploatacja złóż paliw kopalnych oraz odprowadzanie zanieczyszczeń miejskich do rzek [9,10]. Z kolei cykloalkany mogą występować w przyrodzie naturalnie, wchodząc w skład terpenoidów oraz lipidów wydzielanych przez bakterie i rośliny. Zanieczyszczenia alicylkicznymi węglowodorami powstają najczęściej na skutek działalności człowieka, takiej jak produkcja nylonu, rozpuszczalników, czy też stosowanie herbicydów i insektycydów [8].

Ostatnia grupa związków wchodzących w skład ropy naftowej to węglowodry aromatyczne. Wśród nich wyróżnia się substancje mono- i wielopierścieniowe, a ich podatność na rozkład biologiczny maleje wraz ze wzrostem masy cząsteczki i liczby pierścieni w strukturze. Występujące w przyrodzie związki aromatyczne pochodzą najczęściej z termicznych reakcji geologicznych lub pożarów buszu. Antropogeniczne zanieczyszczenia tego typu, w dużym stopniu zagrażające ludziom, to najczęściej pochodne benzenu oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, dostające się do środowiska w wyniku emisji spalin, spalania paliw i odpadów oraz wycieków produktów ropopochodnych [11,12]. Ponadto, w składzie ropy naftowej odnaleźć można również inne związki, np. heterozwiązki zawierające siarkę, azot lub tlen (siarkowodór, merkaptany, fenole, kwasy tłuszczowe, pirydyna, chinolina, pirol i in.), żywice i asfalteny oraz zanieczyszczenia

w postaci wody lub soli [13,14]. Degradacja węglowodorów ropopochodnych z udziałem mikroorganizmów polega na ich oksydacji i rozkładzie enzymatycznym do odpowiadających im alkoholi, bursztynianu, pirogronianu, aldehydu octowego czy acetylo-CoA, które mogą być następnie wykorzystane przez komórkę np. w cyklu kwasu cytrynowego [8,15].

Badania nad dystrybucją związków hydrofobowych dostających się do środowiska wskazują na ich migrację w profilach glebowych, wodach słodkich i słonych, co sprzyja szybkiemu i niekontrolowanemu rozprzestrzenianiu się tych zanieczyszczeń (Rysunek I. 2).



Rysunek I. 2. Schemat migracji zanieczyszczeń węglowodorowych w środowisku (na podstawie [4])

W zależności od budowy i masy cząsteczkowej hydrofobowych węglowodorów ropopochodnych, obserwuje się ich przemieszczanie z miejsca wystąpienia pierwotnego zanieczyszczenia, w głąb profilu glebowego, transport wraz z wodami podziemnymi w postaci cienkiego filmu na powierzchni wody (NAPL, ang. *non-aqueous phase liquid*) lub akumulację w osadach dennych. Węglowodory o niskiej masie cząsteczkowej i wysokiej lotności ulegają odparowaniu lub migracji do fazy nienasyconej gleby, podczas gdy ciężkie węglowodory migrują w dół i osiadają na skale macierzystej gleby [4].

Jak już wspomniano, cechą charakterystyczną węglowodorów wchodzących w skład ropy naftowej jest ich wysoka toksyczność dla środowiska i ludzi. Węglowodory monoaromatyczne, takie jak benzen, toluen, etylobenzen czy ksylen posiadają właściwości mutagenne; związki chlorowcopochodne działają rakotwórczo i teratogennie, a węglowodory alifatyczne mogą działać paraliżująco na ośrodkowy układ nerwowy [16]. Ponieważ związki wchodzące w skład ropy naftowej stanowią poważne zagrożenie w przypadku ich niekontrolowanego uwolnienia do środowiska konieczne było ustalenie poziomu ich dopuszczalnych stężeń w wodzie i glebie oraz ich monitorowanie.

1.2. Normy oraz dopuszczalne poziomy związków węglowodorowych w środowisku, w Polsce i na świecie

Zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady Europejskiej (WE) nr 1272/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie klasyfikacji, oznakowania i pakowania substancji i mieszanin, w celu ochrony zdrowia ludzi i środowiska oraz osiągnięcia zrównoważonego rozwoju, kraje należące do Unii Europejskiej zobowiązane są do klasyfikowania substancji chemicznych oraz monitorowania ich poziomu w środowisku. Z kolei na mocy rozporządzenia Parlamentu Europejskiego oraz Ustawy z dnia 27 kwietnia 2001 r. „Prawo ochrony środowiska" określono dopuszczalne w Polsce stężenia węglowodorów w glebie (Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi; Dz. U. 2016, poz. 1395) (Tabela I. 1.). W tabeli przedstawiono również wartości referencyjne dla poszczególnych zanieczyszczeń w krajach spoza UE. Organem odpowiedzialnym za wydawanie międzynarodowych rekomendacji i regulacji dotyczących norm dopuszczalnych stężeń węglowodorów w środowisku jest Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) [17,18], a na podstawie tych dokumentów ustalane są następnie krajowe zalecenia.

Dane przedstawione w Tabeli I. 1 wskazują na duże różnice w dopuszczalnych poziomach zanieczyszczeń obowiązujących w glebie w danym kraju, co jest wynikiem stosowania różnych systemów oceny zanieczyszczenia gleb przez poszczególne państwa. W większości z analizowanych przypadków, akceptowalny poziom zanieczyszczeń jest zależny od typu użytkowania gleby (w niektórych przypadkach z wyszczególnieniem głębokości poniżej poziomu terenu) oraz dominującego rodzaju gleb na terenie danego państwa.

Tabela I. 1. Wykaz dopuszczalnych norm zawartości węglowodorów wchodzących w skład ropy naftowej na terenach użytkowanych mieszkaniowo w Polsce, Wielkiej Brytanii, Holandii, Niemczech, Nowej Zelandii i Kanadzie

Substancja	Dopuszczalne zawartości substancji powodujących ryzyko na terenach użytkowanych mieszkaniowo [mg/kg]									
	Polska [19]		Wielka Brytania [20]	Holandia [21]	Niemcy [22]	Nowa Zelandia [23]			Kanada [24]	
	Głębokość ([m] poniżej poziomu terenu)									
	<0,25	>0,25[1]				<1	1-4	>4	≤1,5	>1,5
Suma węglowodorów C_6-C_{12}, składników frakcji benzyn	1	50	b. d.	b. d.	200	120	120	650		150
Suma węglowodorów C_{12}-C_{35}, składników frakcji oleju	30	1000	b. d.	b. d.	b. d.	b. d.	b. d.	b. d.		2800
Węglowodory aromatyczne:										
- benzen	0,1	1	0,33	0,03	1	1,1	1,9	2,4	0,03	0,03
- etylobenzen	0,1	1	350	0,03	202	8,21	8,21	120	0,08	0,08
- toluen	0,1	1	610	0,03	202	311	311	230	0,37	0,37
- ksyleny	0,1	1	230	0,08	202	8,21	8,21	180	11	11
- styren	0,1	1	-	0,03	-	b. d.	b. d.	b. d.	5	5

[1] stężenie węglowodorów w glebie, powyżej którego tworzy się oddzielna frakcja węglowodorów, niemieszająca się z koloidem glebowym

[2] wartość łączna dla mieszaniny BTEX

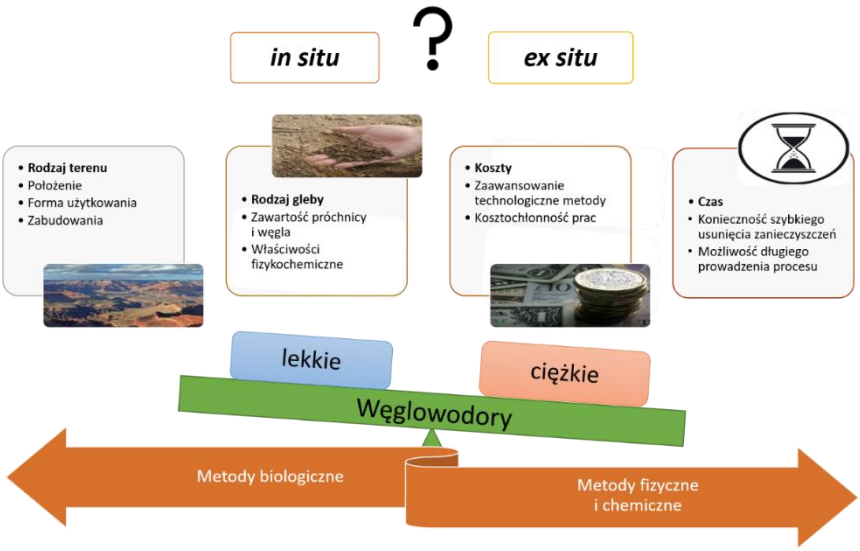
Jednakże, w przypadku Niemiec podana wartość dopuszczalnego poziomu zanieczyszczeń dla pojedynczych węglowodorów przedstawia wartość sumaryczną dla mieszaniny BTEX (benzen, etylobenzen, toluen, ksyleny).

Porównując dopuszczalne wartości poziomu skażenia gleby na analizowanej głębokości (0-0,25 m Polska; <1 m Nowa Zelandia; ≤1,5 m Kanada), należy stwierdzić że, najbardziej restrykcyjne dopuszczalne sumaryczne poziomy zanieczyszczeń węglowodorowych frakcji lekkiej (C_6-C_{12}) oraz ciężkiej (C_{12}-C_{35}) obowiązują w Holandii i Polsce. Z kolei akceptowalne poziomy zanieczyszczeń w przypadku pojedynczych węglowodorów aromatycznych dostających się do gleby są najniższe w Kanadzie (benzen, etylobenzen i toluen), Holandii (wszystkie wyszczególnione węglowodory) oraz Polsce (ksyleny i styren). Zaobserwowano również, że najwyższe dopuszczalne poziomy stężenia węglowodorów w glebie występują w Nowej Zelandii. Ponadto, normy wskazują na tworzenie się tam oddzielnej fazy węglowodorowej w koloidzie glebowym w wyniku zanieczyszczenia etylobenzenem, toluenem i ksylenami [23]. Równie wysokie normy poziomu

zanieczyszczeń gleby obowiązują w Wielkiej Brytanii, gdzie skażenie danego obszaru wyznaczane jest na podstawie przewidywanej toksyczności i poziomu ekspozycji na poszczególne węglowodory [20]. Należy wyraźnie podkreślić, że produkty ropopochodne występujące w środowisku w postaci plam pływających po powierzchni czy zanieczyszczeń rozpuszczonych w wodzie, a także zaadsorbowanych na cząstkach gleby, czy wypełniających parami przestrzenie między jej cząstkami w znacznym stopniu oddziałują na składniki biotyczne i abiotyczne gleby [16], a zagrożenia związane z ekspozycją na węglowodory powodują, że ich efektywne usuwanie jest jednym z kluczowych problemów związanych z ochroną środowiska i bezpieczeństwem zdrowotnym ludzi.

1.3. Metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych

Do usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych z gleby wykorzystywane są różnorodne metody fizyczne, chemiczne i biologiczne. Dobór najwłaściwszej zależy od szeregu czynników takich jak: rodzaj zanieczyszczenia, miejsce wystąpienia skażenia, rodzaj gleby (zawartość próchnicy, pojemność sorpcyjna gleby), koszty implementacji wybranej metody oraz jej czasochłonność [25]. W przypadku „świeżych" zanieczyszczeń stosowane są najczęściej metody mające na celu zahamowanie rozprzestrzeniania się skażenia oraz jego usunięcie, natomiast w przypadku zanieczyszczeń długotrwałych i powstałych wiele lat wcześniej wykorzystuje się techniki mające na celu ich trwałe i efektywne usunięcie. Rysunek I. 3. przedstawia schemat doboru metody usuwania zanieczyszczeń z uwzględnieniem wymienionych parametrów.



Rysunek I. 3. Czynniki wpływające na wybór optymalnej metody usuwania zanieczyszczeń na danym terenie (na podstawie [16,25,26])

Rodzaj gleby, jej pojemność sorpcyjna oraz zawartości próchnicy są parametrami, które istotnie wpływają na siłę wiązania zanieczyszczeń ze składnikami próchniczymi podłoża, co ma bezpośrednie przełożenie na efektywność ich usuwania. Parametry przedstawione na Rysunku I. 3 są kluczowymi przy doborze optymalnej metody usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych. Jak wspomniano powyżej, techniki remediacyjne można podzielić na trzy główne grupy. Pierwsze z nich to metody fizyczne polegające na zastosowaniu sorbentów naturalnych i syntetycznych, skiwerów i separatorów, płukaniu, wentylacji, ogrzewaniu parą wodną a także wykorzystaniu metod termicznych (odparowanie, spalanie, zastosowanie promieni mikrofalowych lub podczerwonych). Kolejną grupę stanowią metody chemiczne, wśród nich wyróżniamy techniki takie jak dehalogenacja, utlenianie i redukcja, inertyzacja oraz elektrochemiczne wymuszanie migracji zanieczyszczeń. Ostatnią grupę stanowią metody biologiczne, wśród których wyróżnić można bioaugmentację, biowentylację, biostymulację, fitoremediację czy landfarming [16,25]. Spośród wymienionych metod oczyszczania gruntów stale rosnącym zainteresowaniem cieszą się techniki biologiczne. Ich zastosowanie niesie ze sobą szereg korzyści, wśród których należy wymienić niskie koszty prowadzenia procesu, możliwość działania w miejscu wystąpienia skażenia (*in situ*), degradację związków prowadzącą do uzyskania nietoksycznych produktów końcowych, niewielką ingerencję w środowisko naturalne oraz wykorzystanie procesów naturalnie zachodzących w glebie. Czynnikami limitującymi biologiczne usuwanie zanieczyszczeń ropopochodnych są natomiast: warunki środowiskowe występujące w miejscu skażenia (odczyn pH gleby, wilgotność, dostępność tlenu, zasolenie, dostępność innych substancji odżywczych), czas potrzebny na oczyszczenie terenu oraz występowanie mikroflory zdolnej do degradacji zanieczyszczeń [26]. Jednak dzięki postępowi technologicznemu możliwe jest zastosowanie odpowiednich czynników modyfikujących czynniki limitujące, co pozwala na szersze wykorzystanie oraz poprawę efektywności procesów biologicznych.

2. Mikroorganizmy w usuwaniu zanieczyszczeń

Kluczowym czynnikiem pozwalającym na biologiczny rozkład zanieczyszczeń jest obecność mikroorganizmów (między innymi bakterii lub grzybów), zdolnych do pobierania związków ropopochodnych i przekształcania ich na drodze przemian metabolicznych w nietoksyczne produkty. Bakterie zdolne do rozkładu zanieczyszczeń węglowodorowych są

izolowane zarówno ze środowiska wodnego, jak i lądowego, i należą do jednego z 25 rodzajów, wśród których najważniejszymi są mikroorganizmy z rodzajów: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* oraz *Pseudomonas*. Mikroorganizmy te charakteryzują się specyficznymi właściwościami zewnątrzkomórkowymi oraz posiadają odpowiedni aparat enzymatyczny pozwalający im na rozkład związków ropopochodnych [27].

2.1. Budowa i właściwości mikroorganizmów

Bakterie stanowią osobną domenę jednokomórkowych organizmów o budowie prokariotycznej. Charakteryzują się one prostą strukturą, brakiem otoczki błonowej wokół organelli komórkowych oraz naturalnymi, wysokorozwiniętymi zdolnościami adaptacyjnymi do warunków środowiskowych [28]. Barierami oddzielającymi komórkę od środowiska są ściana komórkowa oraz błona komórkowa, zapewniające selektywny transport i wymianę substancji pomiędzy komórką a otoczeniem. Ściana komórkowa zbudowana z peptydoglikanu i polisacharydów połączonych peptydami pełni funkcję ochronną i zwiększa odporność bakterii na czynniki środowiskowe. Z kolei znajdująca się pod nią błona komórkowa składa się z dwuwarstwy lipidowej oraz białkowych struktur transportowych. Wewnątrz komórki, w cytoplazmie zanurzone jest DNA i plazmidy, rybosomy i kompleksy białkowe oraz struktury służące do magazynowania wybranych składników odżywczych (np. inkluzje, wakuole, karboksysomy) [29].

Jak wspomniano, cechą charakterystyczną bakterii jest ich wysoka zdolność do dostosowywania się do zmiennych warunków otoczenia. Modyfikacje zachodzące w komórkach mogą mieć efekt trwały lub tymczasowy (znikać po ustąpieniu czynnika wywołującego modyfikacje) i polegają głównie na przekształceniu funkcji biochemicznych i biofizycznych komórek. Mechanizmami sterującymi tymi adaptacjami są zazwyczaj mutacje zachodzące w materiale genetycznym bakterii, horyzontalny transfer genów czy amplifikacja odcinków kodujących wybrane funkcje. Procesy te skutkują zmianami właściwości powierzchniowych komórek, aktywności aparatu enzymatycznego, modyfikacjami białek błonowych czy wydzielaniem określonych substancji zewnątrzkomórkowych np. egzopolisacharydów (EPS – ang. *exopolymeric substances*) [30].

2.2. Cechy warunkujące efektywny transport i metabolizm zanieczyszczeń węglowodorowych

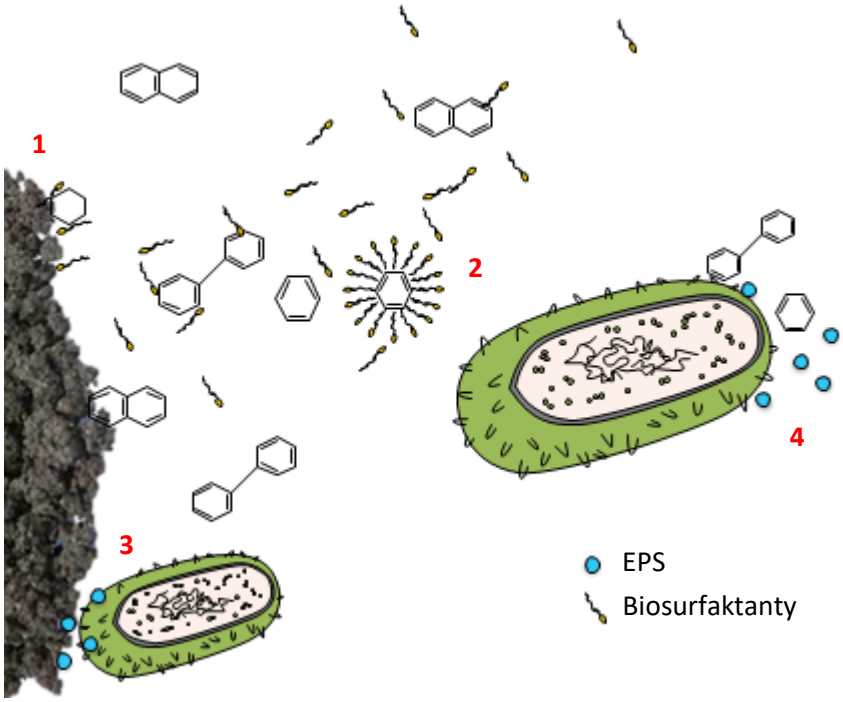
Najważniejszymi procesami w cyklu życiowym bakterii są wzrost i namnażanie się. Pierwsza z tych cech warunkowana jest zdolnościami komórki do efektywnego transportu i utylizowania składników odżywczych. Transport związków, będących substratami w procesach metabolicznych przez błonę komórkową odbywa się z wykorzystaniem białek transportowych i może być pierwszym czynnikiem limitującym wzrost mikroorganizmów. W przypadku węglowodorów, głównym ograniczeniem biologicznej dostępności tych związków dla bakterii (biodostępności) jest ich hydrofobowy charakter oraz niewielka rozpuszczalność w wodzie. Jednocześnie biodostępność to parametr krytyczny w odniesieniu do podatności zanieczyszczeń na rozkład i zmniejszenie ich szkodliwości dla zdrowia i życia ludzi oraz negatywnego wpływu na jakość środowiska. W celu pokonania trudności związanych z dostępnością węglowodorowych substratów, mikroorganizmy zdolne do degradacji węglowodorów najczęściej charakteryzują się hydrofobowym charakterem powierzchni, zwiększonym potencjałem elektrokinetycznym oraz zdolnością wydzielania substancji zewnątrzkomórkowych (np. EPS, czy biosurfaktanty) wspomagających emulgację zanieczyszczeń i ułatwiających ich transport do komórki [31].

Na biodostępność zanieczyszczeń węglowodorowych składają się dwa główne czynniki: biologiczna dostępność dla mikroorganizmów degradujących dany związek (zdolność związku do przechodzenia do roztworu glebowego, skąd jest pobierany przez mikroorganizmy) oraz aktywność chemiczna zanieczyszczeń, wpływająca na ich zdolność migracji oraz rodzaj i siłę wiązania z matrycami stałymi; jak również współczynnik podziału (współczynnik równowagowy związku zaadsorbowanego na cząstkach stałych i rozpuszczonego w roztworze glebowym). Decydują one o spontanicznym podleganiu związku procesom fizykochemicznym. Biodostępność węglowodorów jest kluczowym parametrem pozwalającym na ocenę zagrożeń, ustalanie priorytetów oraz zarządzanie skażeniami w środowisku [32].

W ocenie biodostępności ropopochodnych związków hydrofobowych dla mikroorganizmów oraz cech bakterii warunkujących ich zwiększone powinowactwo do tego typu substancji aktywność chemiczna zanieczyszczeń jest najczęściej pomijana, ponieważ ze względu na uwarunkowania fizykochemiczne tego parametru nie mają one dużego znaczenia

w odniesieniu do biodegradacji związków. Biorąc pod uwagę zdolność bakterii do pobierania związków odżywczych głównie z roztworów wodnych, najistotniejszą cechą zanieczyszczeń hydrofobowych z punktu widzenia ich biologicznej dostępności, jest ich zdolność do przechodzenia do roztworu glebowego, a następnie modyfikacja parametrów komórki pozwalająca na zwiększenie powinowactwa i adsorpcję substratów ropopochodnych [32,33] (Rysunek I. 4).

Wytwarzane przez komórki substancje zewnątrzkomórkowe, takie jak egzopolisacharydy (EPS) oraz biosurfaktanty wykazują wielokierunkowe działanie zwiększające powinowactwo komórek do hydrofobowych substratów. Te drugie, dzięki właściwościom emulgującym, ułatwiają desorpcję zanieczyszczeń z cząstek stałych do roztworów (1) oraz wspomagają procesy ich transportu do komórek poprzez zamykanie zanieczyszczeń w micelach (2). Z kolei EPS uczestniczą w procesach adhezji komórek i warunkują tworzenie biofilmu (3). Ponadto, wydzielane przez komórki związki mogą osadzać się na ich powierzchni pełniąc zarówno funkcję ochronną przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi, jak i zwiększać hydrofobowość powierzchni komórek (4) [33,34].



Rysunek I. 4. Biodostępność zanieczyszczeń dla mikroorganizmów (na podstawie [33-35])

Hydrofobowość powierzchni komórek (CSH – ang. *cell surfce hydrophobicity*) definiowana jest najczęściej jako powinowactwo danej cząstki do rozpuszczalników polarnych (w tym przypadku wody). Hydrofobowość jest siłą napędową procesu adhezji komórek do substratów lub powierzchni cząstek stałych, gdy odległość od danej powierzchni jest duża, a także sprzyja autoagregacji mikroorganizmów. Parametr ten jest również niezwykle istotny, gdy w środowisku brak jest łatwo dostępnych źródeł węgla, a komórki muszą przyswajać związki hydrofobowe, takie jak zanieczyszczenia węglowodorowe. Zaobserwowano, że komórki posiadające wysoką hydrofobowość powierzchni łatwiej wchodzą w interakcje z cząstkami hydrofobowymi w środowisku, dążąc do usunięcia cząstek wody znajdujących się pomiędzy nimi [35]. Wzrost hydrofobowości powierzchni jest też obserwowany jako element mechanizmu obronnego bakterii przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, takimi jak ciśnienie osmotyczne, szok cieplny, czy denaturujące warunki środowiskowe (obecność długołańcuchowych alkoholi czy EDTA) [36]. Doniesienia literaturowe wskazują także, że hydrofobowość powierzchni bakterii eksponowanych na węglowodory zwiększa się, wpływając korzystnie na powinowactwo do hydrofobowych substratów oraz zwiększając ich dyfuzję do komórek. Dzieje się tak ponieważ rozpuszczone w roztworze glebowym substancje hydrofobowe wykazują większe powinowactwo do mikroorganizmów o zbliżonym charakterze powierzchni [37].

Kolejnym istotnym czynnikiem, mającym wpływ na oddziaływania komórka-substancje hydrofobowe jest potencjał elektrokinetyczny (potencjał dzeta), warunkujący przyłączanie zanieczyszczeń do powierzchni komórek. Jest to parametr opisujący oddziaływania elektrokinetyczne zachodzące w zewnątrzkomórkowej podwójnej warstwie elektrycznej. Warto pokreślić, że niewielka bariera elektrokinetyczna ułatwia przyłączanie zanieczyszczeń do komórek, a mikroorganizmy charakteryzujące się potencjałem elektrokinetycznym bliskim neutralnego wykazują największą adhezję do węglowodorów [38].

Zmiany wartości ładunku powierzchniowego komórek i ich potencjału elektrokinetycznego odzwierciedlają również często zmiany w przepuszczalności błony komórkowej [39]. W kontakcie z trudno dostępnymi związkami hydrofobowymi błona komórkowa ulega rozluźnieniu i upłynnieniu (poprzez zmianę stosunku kwasów tłuszczowych *cis* i *trans* oraz proporcji kwasów nasyconych i nienasyconych), co wpływa na

jej zwiększoną przepuszczalność w stosunku do transportowanych zanieczyszczeń [40,41]. Zewnętrzna warstwa oddzielająca komórki od środowiska składa się ze ściany komórkowej oraz błony komórkowej, która w zależności od rodzaju mikroorganizmów jest jedno- (bakterie gram-dodatnie) lub dwuwarstwowa (bakterie gram-ujemne). Zewnętrzna błona komórkowa bakterii gram-ujemnych zbudowana z fosfolipidów i lipopolisacharydów pełni funkcję wybiórczej membrany, która uniemożliwia wnikanie do wnętrza komórki cząstek o masie większej niż 1000 Da [40]. Związki hydrofobowe obecne w środowisku mogą przenikać do komórek na drodze dyfuzji lub poprzez transport aktywny. Węglowodory o dużej masie cząsteczkowej są pobierane przez komórki głównie na drodze transportu aktywnego, a za ich transport przez błonę odpowiedzialne są specyficzne białka należące do rodziny TodX lub FadL. Białka FadL są najlepiej scharakteryzowanymi transporterami błonowymi substancji hydrofobowych zidentyfikowanymi u bakterii *Escherichia coli*. Drugą grupą białek biorących udział w aktywnym transporcie zanieczyszczeń, takich jak toluen czy mieszanina BTEX są białka z rodziny TodX zidentyfikowane u *Pseudomonas putida* F1 (TodX); *Ralstonia pickettii* PKO1 (TbuX), *Pseudomonas putida* (XylN) czy *Pseudomonas mendocina* (TmoX) [41]. Z kolei niewielkie, polarne węglowodory cykliczne są transportowane przez membranę na drodze dyfuzji, a głównym czynnikiem wpływającym na efektywność tego transportu jest przepuszczalność membrany. Związki hydrofobowe wnikające w strukturę membrany mogą zaburzać jej gospodarkę energetyczną oraz akumulować się wewnątrz, niszcząc jej strukturę [40]. Szybkość wnikania węglowodorów ropopochodnych do komórek zależy od ich współczynnika podziału oraz kinetyki nasycenia danym związkiem, co potwierdziły badania prowadzone dla takich substratów jak: fenantren [42], naftalen [43], fenol [44] i benzo(a)piren [45] w obecności azydku sodu, który jest inhibitorem ATP. Wzrost płynności bakteryjnej błony komórkowej obserwowany podczas biodegradacji zanieczyszczeń oraz zmiany stosunku budujących ją kwasów *trans* i *cis*, są mechanizmami wspomagającymi transport zanieczyszczeń hydrofobowych do wnętrza komórek. Jednak zbyt duże zmiany w strukturze membrany mają efekt toksyczny dla mikroorganizmów. Należy również podkreślić, że dokładny mechanizm oddziaływania zanieczyszczeń hydrofobowych na membrany biologiczne nie został jeszcze do końca przebadany i wymaga zaawansowanych badań [46].

2.3. Bioaugmentacja i jej wykorzystanie w remediacji zanieczyszczeń

Cechy warunkujące efektywny transport i metabolizm zanieczyszczeń węglowodorowych oraz możliwość modyfikacji właściwości powierzchniowych komórek zwiększających biodostępność związków hydrofobowych są unikalnymi właściwościami niewielkiej grupy bakterii, należących do 25 rodzajów mikroorganizmów [27]. Ograniczenie korzystnych atrybutów i odporności na toksyczne działanie ksenobiotyków do wyspecjalizowanych mikroorganizmów powoduje, że ich obecność i działanie są preferowane w miejscu wystąpienia zanieczyszczenia poddawanego remediacji z udziałem bakterii. Technika usuwania zanieczyszczeń poprzez wprowadzenie do środowiska wyselekcjonowanych mikroorganizmów o potwierdzonych zdolnościach degradacyjnych to bioaugmentacja. Jest ona jedną z metod biologicznej remediacji gruntów z zanieczyszczeń (bioremediacji). Zastosowanie bioaugmentacji pozwala na uzyskanie wysokiej efektywności usuwania zanieczyszczeń bądź przekształcania ich do form nietoksycznych, przy jednoczesnym utrzymaniu niewielkiej inwazyjności i znikomego wpływu na autochtoniczną florę. Dodatkowo, technika ta nie wymaga wykorzystania skomplikowanej aparatury i jest procesem relatywnie tanim [47]. W Tabeli I. 2 przedstawiono przykłady wykorzystania tej techniki do rekultywacji terenów skażonych.

Przedstawione w Tabeli I. 2 przykłady wskazują na szerokie i efektywne wykorzystanie bioaugmentacji w technologiach oczyszczania wód i gruntów z zanieczyszczeń węglowodorowych. Bioaugmentacja może być wykorzystywana zarówno do degradacji zanieczyszczeń w glebie [48,50,52–55], jak i środowisku wodnym – oczyszczalniach ścieków [49] czy wodzie morskiej [51]. Ponadto, istnieje możliwość efektywnego zastosowania tej techniki nawet w bardzo zanieczyszczonych środowiskach, jak w przypadku osadów z oczyszczalni ścieków przy rafinerii, gdzie stężenie węglowodorów w pobranych próbkach wynosiło ponad 143 mg na kilogram osadu [49]. Dodatkowo, badania przeprowadzone przez Poi i wsp. [50], wskazują na możliwość całkowitej degradacji węglowodorów już w czasie 21 dni, przy zastosowaniu konsorcjum o szerokim spektrum mikroorganizmów. Przedstawione wyniki dowodzą, że większą efektywnością usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych charakteryzują się wieloskładnikowe konsorcja mikroorganizmów, a dodatkowe czynniki biostymulujące takie jak napowietrzanie, czy dodatek azotu lub fosforu wpływają korzystnie na działalność degradacyjną

mikroorganizmów [49–51,54]. Należy również zauważyć, że wydajności procesu degradacji węglowodorów ropopochodnych w glebie przez pojedyncze szczepy nie przekraczały 40% nawet po 180 dniach prowadzenia procesu, niezależnie od rodzaju wprowadzanych mikroorganizmów, co może wskazywać na niewystarczającą aktywność metaboliczną lub zbyt małą biodostępność związków ropopochodnych dla pojedynczych bakterii [48,53]. Jednocześnie, bardzo wysoką wydajnością usuwania wybranych węglowodorów z grupy WWA w wodzie słonej charakteryzował się szczep *R. erythropolis* T902.1, który w ciągu 35 dni usunął całkowicie antracen, fenantren i fluoranten z badanych próbek osadów namorzynowych. Autorzy wskazują w tym przypadku na korzystne działanie optymalnych warunków temperatury, pH oraz obecność dodatkowych składników odżywczych i znajdujących się w miejscu prowadzenia badań korzeni drzew jako czynników wspomagających procesy degradacyjne [51].

Jednocześnie, autorzy przedstawionych w Tabeli 2 badań zwracają uwagę na występowanie fazy *plateau* podczas mikrobiologicznej degradacji zanieczyszczeń węglowodorowych, która może być wynikiem wyczerpania się biodostępnych substratów lub składników nieorganicznych takich jak azot i fosfor, skutkując pozostaniem pewnej ilości szkodliwych związków w środowisku [51,53,55].

Tabela I. 2. Przykłady wykorzystania bioaugmentacji do usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych z różnych środowisk

Związek	Inokulowana matryca	Mikroorganizm	Inne czynniki	Czas trwania	Efektywność degradacji [%]	Metoda oznaczenia	Lit.
Węglowodory ropopochodne	Gleba (węglowodory 12,0 g/kg)	*Rhodococcus erythropolis* CD 130	-	182 dni	29,83 ± 3,84	GC (norma ISO16703:2011)	[48]
		Rhodococcus erythropolis CD 167			38,40 ± 2,61		
		Rhodococcus erythropolis CD 130 I 167			29,72 ± 1,69		
Węglowodory ropopochodne	Osad z oczyszczalni ścieków przy rafinerii (węglowodory 143,8 g/kg)	mieszanina ośmiu szczepów: *Bacillus* sp. GR1-01, GR1-02, GR1-05, GR1-13, GR1-14, Gr1-15, GR1-21, GR1-E1	-	120 dni	41 ± 2,05	GC (norma US EPA 3530)	[49]
			dodatek azotu		63,3 ± 3,17		
			dodatek fosforu		57,3 ± 2,87		
			dodatek azotu i fosforu		75 ± 3,75		
Węglowodory ropopochodne	Gleba (węglowodory 26,8 g/kg)	Konsorcjum 22 szczepów (z rodzajów *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* i *Brevibacillus*)	napowietrzanie	21 dni	100	GC (norma US EPA 8015a)	[50]
Mieszanina antracenu (Ant), fenantrenu (Phe), pyrenu (Pyr) i fluorantenu (Flt)	Osad denny z estuarium Wouri (węglowodory 10,0 g/kg)	*Rhodococcus erythropolis* T902.1	-	35 dni	97,3 ± 2,7(Ant) 100 ± 0,1 (Phe) 66,3 ± 1,2 (Pyr) 100 ±0,1 (Flt)	HPLC	[51]
			dodatek MSM		100 ± 0,1 (Ant) 100 ± 0,1 (Phe) 59,5 ± 1,4 (Pyr) 100 ±0,1 (Flt)		

Tabela I. 2. Przykłady wykorzystania bioaugmentacji do usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych z różnych środowisk

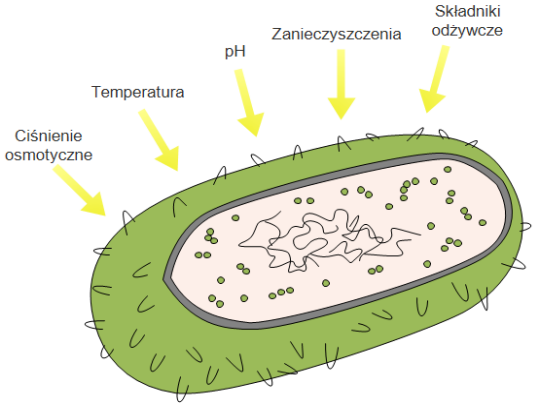
Związek	Inokulowana matryca	Mikroorganizm	Inne czynniki	Czas trwania	Efektywność degradacji [%]	Metoda oznaczenia	Lit.
WWA	Gleba (węglowodory 7,4 g/kg)	Konsorcjum 8 szczepów (z rodzajów: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* i *Arthrobacter*)	-	120 dni	72,9 ± 4,6	RP-HPLC (norma US EPA 610)	[52]
Węglowodory ropopochodne	Gleba (węglowodory 44,6 g/kg)	*Acinetobacter* SZ-1	-	180 dni	34 ± 2.7	Analizator zawartości oleju w podczerwieni	[53]
Węglowodory ropopochodne	Gleba (węglowodory 20,0 g/kg)	*Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis*	- dodatek MSM	60 dni	65,3 ± 0,5 91,5 ± 0,5	GC	[54]
Olej silnikowy	Gleba (węglowodory 39,0-41,0 g/kg)	*Pseudomonas putida* TPHK-1 *Pseudomonas aeruginosa* TPHK-4	-	90 dni	59 63	GC	[55]

3. Wpływ węglowodorów alifatycznych i aromatycznych na komórki mikroorganizmów

Jak już wspomniano, zanieczyszczenia węglowodorowe wykazują szerokie, wielokierunkowe spektrum oddziaływania na komórki mikroorganizmów. Ze względu na ich zróżnicowaną biodostępność, najczęściej jako najbardziej podatne na rozkład biologiczny wymieniane są prostołańcuchowe alkany, następnie rozgałęzione alkany, małocząsteczkowe związki aromatyczne, alkany cykliczne, kończąc na związkach wielkocząsteczkowych oraz węglowodorach polarnych [27]. Obecność w środowisku trudnodostępnych substancji odżywczych może zmniejszać dostępność łatwo przyswajalnych źródeł węgla, a w przypadku obecności jedynie węglowodorów, powodować stres metaboliczny związany z niedoborem składników pokarmowych [56].

3.1. Stres metaboliczny i odpowiedź komórkowa

Mikroorganizmy narażone na działanie niekorzystnych czynników podlegają działaniu stresu metabolicznego. Jest to stan, opisywany też jako VBNC (żywe, ale nie namnażające się, ang. *viable but nonculturable*), w który bakterie przechodzą spontanicznie, na drodze uruchamiania pewnych mechanizmów obronnych. Komórki w tym stanie charakteryzują się m. in. obniżoną aktywnością fizjologiczną i metaboliczną, syntezą specyficznych białek zwiększających odporność na czynnik stresowy, modyfikacjami błony komórkowej czy zmianą kształtu komórek [57]. Stres metaboliczny może być wywoływany przez różne czynniki, takie jak ciśnienie osmotyczne, temperatura, pH, obecność zanieczyszczeń oraz dostępność składników odżywczych (węgla, azotu i fosforu) (Rysunek I. 5).



Rysunek I. 5. Czynniki mogące wywoływać stres u mikroorganizmów

Pomimo wielu negatywnych skutków, stres metaboliczny jest również jednym z głównych czynników napędzających mechanizmy ewolucji organizmów. Wyjście komórek poza stan komfortowej homeostazy i uruchomienie mechanizmów obronnych wywołuje wieloaspektowe zmiany w ich funkcjonowaniu, a utrwalenie modyfikacji w kolejnych pokoleniach może skutkować powstaniem organizmów o nowym znaczeniu ewolucyjnym [58].

Czynniki stresowe oddziałujące na mikroorganizmy mogą wywoływać odpowiedź komórkową na różnych poziomach funkcjonowania organizmu. W zależności od rodzaju i natężenia czynnika stresowego odpowiedź komórki może obejmować procesy od uruchomienia specyficznych szlaków odpowiedzi na warunki stresowe, aż do indukowanej śmierci komórki. Dotychczas zidentyfikowano kilka głównych szlaków odpowiedzi komórki na warunki stresowe: aktywacja białek szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*), reakcja (odpowiedź) komórki na akumulację niesfałdowanych białek (ang. *unfolded proteins response*), reakcja (odpowiedź) na uszkodzenia DNA czy stres oksydacyjny. W przypadku długotrwałego, intensywnego oddziaływania czynnika stresowego indukowana zostaje śmierć komórki na drodze apoptozy, autofagii lub nekrozy [59]. Należy również podkreślić, że mechanizmy odpowiedzi na stres oparte na specyficznych białkach są wysoce konserwatywne ewolucyjnie, a biorące w nich udział proteiny zostały zidentyfikowane zarówno w komórkach bakterii, jak i u ssaków [60].

Pierwszy ze wspomnianych mechanizmów obronnych, aktywacja białek szoku cieplnego (chaperonów, białek opiekuńczych) występuje na skutek akumulacji w komórce

uszkodzonych lub częściowo zdenaturowanych białek. Pierwotnie mechanizm ten został opisany jako odpowiedź biochemiczna komórki na podwyższenie temperatury otoczenia. Późniejsze badania pozwoliły stwierdzić, że jest on również aktywowany np. w przypadku stresu oksydacyjnego, czy ekspozycji na jony metali. Polega on na ekspresji białek opiekuńczych, które poprzez odwracalne związanie się z łańcuchem polipeptydowym wspomagają prawidłowe fałdowanie łańcuchów [61].

Kolejny system odpowiedzi komórkowej jest indukowany przez akumulację niesfałdowanych białek (UPR) w retikulum endoplazmatycznym (ER). Czynnikami wywołującymi tego typu reakcje mogą być: zmniejszenie dostępności składników odżywczych, zhamowanie glikozylacji białek, zaburzenie homeostazy jonów Ca^{2+}, czy niedobór tlenu. Aktywowane w wyniku ich działania różnorodne białka z grupy kinaz i czynników transkrypcyjnych pomagają zbilansować ilość syntezowanych łańcuchów proteinowych z pojemnością retikulum endoplazmatycznego, zapewniając jego większą wydajność. Jednymi z głównych peptydów będących wynikiem odpowiedzi UPR jest ekspresja białek opiekuńczych regulowanych przez glukozę (GRP), pełniących funkcję ochronną w warunkach stresu metabolicznego [62].

Mechanizm odpowiedzi na uszkodzenia DNA zostaje aktywowany w przypadku wykrycia pęknięć DNA, które mogą być wywołane np. przez chemioterapeutyki, promieniowanie podczerwone czy ekspozycję na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Procesy naprawcze indukowane pęknięciami nici DNA obejmują eliminację uszkodzonego nukleotydu i naprawę podwójnej helisy, a następnie zatrzymanie dalszych podziałów komórki ze względu na większe ryzyko uszkodzeń zachodzące podczas procesów replikacji [59].

Ostatni z opisanych w literaturze mechanizmów odpowiedzi komórkowej obejmuje indukcję specyficznych przemian pod wpływem stresu oksydacyjnego wywoływanego przez wolne rodniki tlenu i azotu. Czynniki stresowe mogą w tym przypadku pochodzić zarówno z przemian metabolicznych zachodzących w komórce, jak i ze środowiska zewnętrznego. Komórkowe system antyoksydacyjne mają za zadanie inaktywację wolnych rodników, jednak w przypadku wzrostu potencjału utleniającego w komórce zagrażającego stabilności jej struktur, może dojść do jej apoptozy lub nekrozy [63].

Przedstawione powyżej mechanizmy odpowiedzi komórkowej na czynniki stresowe mają na celu zapobieganie uszkodzeniom komórek i przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiska. W związku z tematyką przedstawionej pracy, szczególną uwagę należy zwrócić na oddziaływanie węglowodorów na komórki bakterii, które mogą wywoływać m. in. stres metaboliczny.

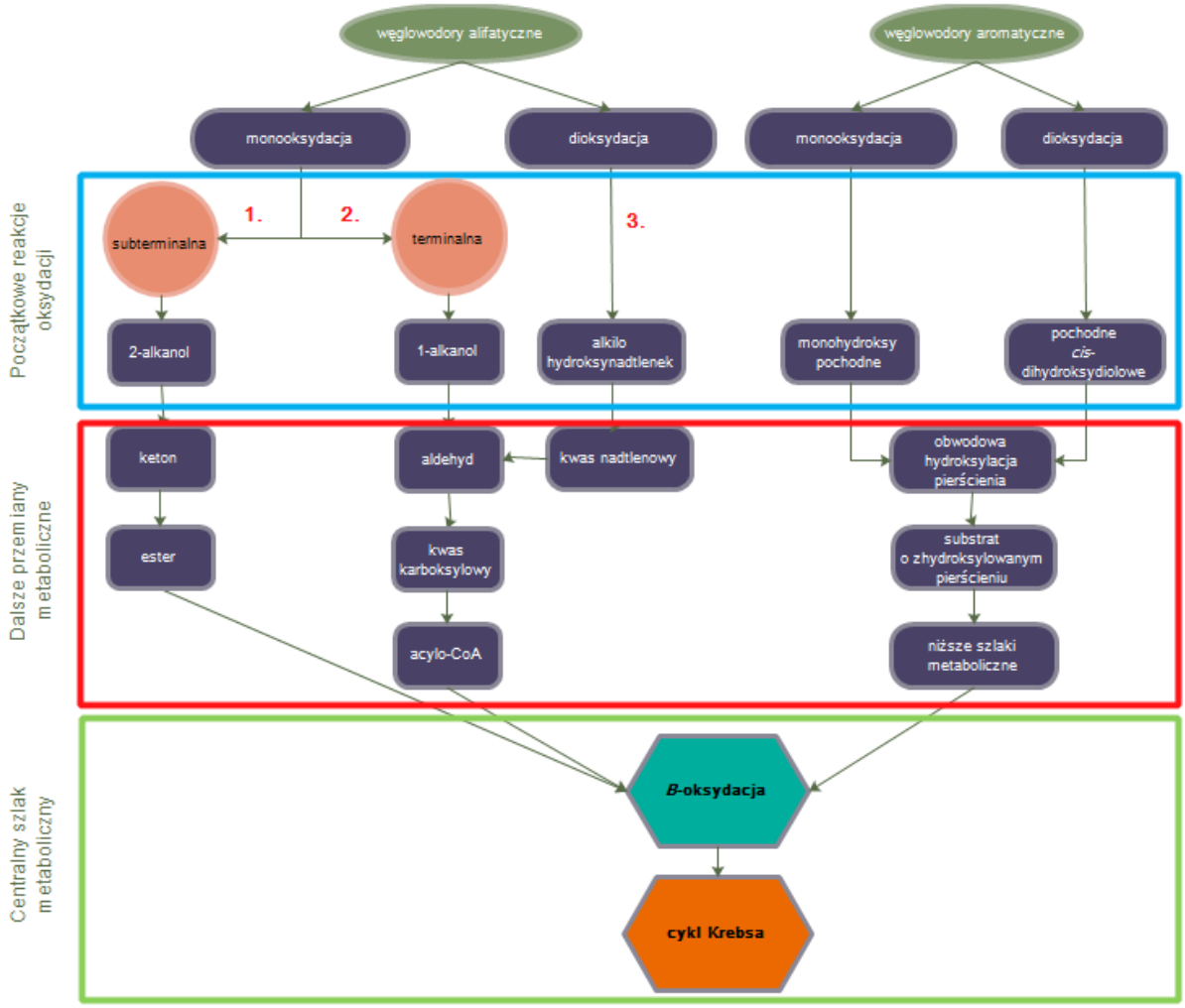
3.2. Szlaki degradacji węglowodorów aromatycznych i alifatycznych

Transportowane do wnętrza komórki zanieczyszczenia podlegają szeregowi przemian biochemicznych, mających na celu zmniejszenie ich toksyczności i pozyskanie substratów energetycznych niezbędnych do przeżycia bakterii. Przeprowadzane przez komórki procesy mikrobiologicznej biodegradacji zanieczyszczeń zachodzą zarówno w środowisku wodnym, jak i lądowym, a dostępność tlenu w poszczególnych przypadkach jest zróżnicowana. W wyniku dostosowywania metabolizmu do wymogów tlenowych środowiska bytowania, mikroorganizmy posługują się różnymi strategiami biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych. W literaturze wyróżniane są dwa główne typy procesów biodegradacji: tlenowa i beztlenowa, jednak należy podkreślić, że ze względu na wysoką reaktywność chemiczną tlenu, procesy enzymatyczne przebiegające w jego obecności są bardziej wydajne [64].

Mechanizm aerobowej biodegradacji zanieczyszczeń węglowodorowych zależy od typu wykorzystywanego substratu, jednak przebieg procesu można podzielić na trzy główne etapy: (I) początkową aktywację substratu; (II) dalsze przemiany metaboliczne oraz (III) włączenie produktów degradacji węglowodorów w centralny szlak metaboliczny komórki. Schematyczny przebieg szlaków tlenowej degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych został przedstawiony na Rysunku I. 6 [64,65].

Prostołańcuchowe alkany są związkami łatwo degradowanymi przez mikroorganizmy z różnych rodzajów, wśród których najczęściej wymienia się bakterie z rodzaju: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter* czy *Sphingomonas*. Produkowane przez te komórki oksygenazy odpowiadają za przyłączenie atomu tlenu do łańcucha węglowodorowego. W zależności od ścieżki degradacji, wbudowanie atomu tlenu może zachodzić na jednym końcu łańcucha alkilowego (oksydacja terminalna), na obu jego końcach (oksydacja diterminalna) lub w wewnętrzną grupę metylenową (suboksydacja).

Oksydacja terminalna [Rysunek I. 6. (1)] skutkuje utworzeniem alkoholu, aldehydu, a następnie kwasu karboksylowego i acetylo-CoA.



Rysunek I. 6. Główne szlaki degradacji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych w komórkach mikroorganizmów (na podstawie [66])

Z kolei przyłączenie atomów tlenu na obu końcach łańcucha alkilowego, katalizowane przez dioksygenazy, prowadzi do powstania formy nadtlenkowej, a w późniejszych etapach kwasu karboksylowego i acetylo-CoA [Rysunek I. 6. (2)]. Produkty obydwu wspomnianych ścieżek degradacji węglowodorów podlegają β-oksydacji i trafiają do cyklu kwasu cytrynowego (TCA). Trzecia możliwa ścieżka degradacji węglowodorów alifatycznych to przeprowadzana z udziałem monooksygenaz oksydacja subterminalna [Rysunek I. 6. (3)] polegająca na przeprowadzeniu alkanu do alkoholu, ketonu, a następnie estru, który może trafić bezpośrednio do TCA [65].

Węglowodory aromatyczne również mogą podlegać degradacji mikrobiologicznej, jednak spektrum mikroorganizmów zdolnych do rozkładu tych związków jest mniejsze niż w przypadku węglowodorów alifatycznych, są to głównie bakterie należące do typów *Proteobacteria* i *Actinobacteria* [67]. Ze względu na wysoką hydrofobowość i stabilność chemiczną węglowodorów aromatycznych ich degradacja wymaga destabilizacji pierścienia aromatycznego na pierwszym etapie przemian. Aktywacja pierścienia aromatycznego na drodze hydroksylacji zachodzi z udziałem wieloskładnikowych systemów enzymatycznych zbudowanych z białek żelazowo-siarkowych, o wysoce konserwatywnej sekwencji [65]. Powstałe produkty zostają utlenione z udziałem dehydrogenaz do katecholu i kwasu protokatechwego. W kolejnym etapie pierścień katecholowy zostaje rozerwany na drodze rozszczepienia intra- (*orto*) lub ekstradiolowego (*meta*), zachodzącego z udziałem, odpowiednio: 1,2- dioksygenazy katecholowej (EC 1.13.11.1) lub 2,3-dioksygenazy katecholowej (EC 1.13.11.2). Białka te należą do dwóch, niespokrewnionych filogenetycznie rodzin, zawierają w centrum aktywnym atom żelaza, a prowadzone przez nie reakcje nie wymagają obecności kofaktorów. Ponadto, dioksygenazy intradiolowe kodowane są chromosomalnie, natomiast dioksygenazy ekstradiolowe – plazmidowo [65,67]. Rozszczepienie typu *orto* zachodzi najczęściej przy udziale 1,2- dioksygenazy katecholowej w pozycji C1/C2 pierścienia katecholowego (lub kwasu protokatechowego/ hydroksychinolu), prowadząc do powstania kwasu *cis*, *cis*-mukonowego (lub jego pochodnych). Natomiast rozpad typu *meta* odbywa się najczęściej z wykorzystaniem 2,3-dioksygenazy katecholowej i polega na rozszczepienia pierścienia katecholowego w pozycjach C2/C3 lub pierścienia protokatechinianu w pozycji C2/C4 lub C4/C5, w wyniku których powstają odpowiednio: semialdehyd 2-hydroksymukonowy lub semialdehyd karboksy-2-hydroksymukonowy. Finalnymi produktami procesów biotransformacji węglowodorów aromatycznych są acetylo-CoA, szczwiooctan, aldehyd octowy, kwas pirogronowy, lub bursztynylo-CoA, które w dalszych etapach procesu są wykorzystywane w cyklu Krebsa [64,65,67,68]. Warto podkreślić, że wpływ na biodegradowalność węglowodorów aromatycznych ma obecność podstawników, przy czym związki z podstawnikami są łatwiej degradowane niż niepodstawione węglowodory aromatyczne [65].

Beztlenowe procesy degradacji węglowodorów rozpoczynają się również od aktywacji pierwotnego substratu, najczęściej poprzez przyłączenie fumaranu, karboksylację lub

hydroksylację. Na terenach długotrwale zanieczyszczonych obserwowano również degradację związków aromatycznych poprzez redukcję metanogeniczną. Należy jednak podkreślić, że zachodząca w warunkach anaerobowych biotransformacja substratów jest wolniejsza i mniej efektywna [64,65].

3.3. Modyfikacje właściwości komórek pod wpływem węglowodorów

Zaprogramowane ewolucyjnie mechanizmy obronne i adaptacyjne umożliwiają komórkom bakterii dostosowywanie się do zmiennych warunków środowiska, celem utrzymania ciągłości populacji. W Tabeli I. 3. przedstawiono najważniejsze cechy komórek mikroorganizmów, których modyfikacje podczas ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe były opisywane w literaturze. Obejmują one głównie zmiany morfologii powierzchni komórek obserwowane za pomocą technik mikroskopowych, modyfikacje hydrofobowości powierzchni komórek (CSH) i ich potencjału elektrokinetycznego, a także agregację bakterii, będące najczęściej wynikiem działania substancji wydzielanych zewnątrzkomórkowo.

Pojawiające się w literaturze doniesienia na temat zmian morfologii powierzchni komórek dotyczą najczęściej czterech głównych modyfikacji obserwowanych przy pomocy skaningowej lub transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Wśród nich wyróżnia się zwiększenie ilości fimbrii, flagelli i pilii, odpowiadających za mobilność komórek mikroorganizmów oraz wzmożoną produkcję wydzielanych zewnątrzkomórkowo egzopolisacharydów. Obecność tych związków odnotowano zarówno dla komórek wzrastających na podłożu zawierającym węglowodory alifatyczne, jak i aromatyczne [69,70]. Uwalniane przez komórki substancje mogą również wpływać na zwiększenie adhezji i sklejanie komórek eksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe, jednak tego typu zmiany były najczęściej obserwowane w przypadku komórek izolowanych z miejsc charakteryzujących się dużą różnorodnością zanieczyszczeń, jak woda z odwiertów czy woda zęzowa [71,72]. Wielu badaczy obserwowało również obecność uwalnianych przez komórki ciałek inkluzyjnych zawierających zanieczyszczenia węglowodorowe. Pęcherzyki te rejestrowano głównie dla bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [73–76], jednak pojawiają się również doniesienia świadczące o ich obecności w komórkach *Rhodococcus* [77], czy bakteriach glebowych [78].

Ostatnia z obserwowanych zmian morfologii bakterii polega na zmianie wielkości komórek, jednak doniesienia literaturowe w tym zakresie nie są jednoznaczne. Hua i Wang

[79] oraz Neumann i in. [80] obserwowali zmniejszenie komórek mikroorganizmów oraz wygładzenie ich powierzchni podczas ekspozycji na oktadekan, fenol i 4-chlorotoluen. Z drugiej strony, Michael i in. [81] zauważyli wydłużenie komórek mikroorganizmów w wyniku ich kontaktu z toluenem.

Prace opisujące modyfikacje hydrofobowości powierzchni komórek dosyć zgodnie potwierdzają dążenie mikroorganizmów do zwiększenia wartości CSH w obecności węglowodorów, jednak jak zauważyli Prabhu i Phale [82] fluktuacje wartości tego parametru są zależne od rodzaju zastosowanego podłoża. Wzrost wartości hydrofobowości powierzchni komórek bakterii obserwowany był wraz ze wzrostem stężenia ksenobiotyków w podłożu [83–85], wyższe wartości obserwowano również dla komórek wzrastających na podłożu z dodatkiem lekkich frakcji węglowodorów [86] oraz długołańcuchowych alkanów [87–89]. Obuekwe i in. [37,90] udowadniali, że wyższą wartością CSH charakteryzują się komórki o wyższym potencjale degradacyjnym, a Baumgarten i in. [36] wskazują, że zmiany te mogą być wynikiem wydzielania przez komórki substancji zewnątrzkomórkowych i uwalniania pęcherzyków błonowych.

Pod wpływem kontaktu mikroorganizmów z węglowodorami zmianom ulegają również wartości potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórek. Podobnie jak w przypadku CSH, badacze odnotowują fluktuacje tego parametru, w zależności od dostępnego dla komórek źródła węgla oraz siły jonowej buforu w którym zawieszone są komórki podczas pomiarów [38,98,100]. Jak zauważyli Górna i in. [97], potencjał dzeta bakterii zwykle obniża się w wyniku kontaktu z zanieczyszczeniami hydrofobowymi. Należy również zwrócić uwagę, że różnice występujące pomiędzy wartościami tego parametru są niewielkie dla mikroorganizmów hodowanych na podłożach zawierającym węglowodory z tej samej grupy (np. alifatyczne, aromatyczne lub PAH) [101], ale mogą być znaczące, gdy np. komórki eksponowane na olej napędowy przeniesie się na podłoże z dodatkiem węglowodorów alifatycznych [100]. Watro także podkreślić istotny wpływ dodatku surfaktantów na obniżenie potencjału elektrokinetycznego bakterii [98].

Wśród często obserwowanych modyfikacji właściwości komórek pod wpływem ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe należy wymienić również zmiany zdolności komórek do agregacji, będące wynikiem produkcji bioflokulantów, która wpływa korzystnie na zdolności degradacyjne mikroorganizmów [102–105].

Tabela I. 3. Zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami

Cecha	Funkcja	Modyfikacje cechy	Źródło węgla	Szczep bakteryjny	Lit.
Morfologia	Wykorzystanie technik mikroskopii elektronowej (skaningowej i transmisyjnej) pozwala na bezpośrednią obsrewację zman morfologii powierzchni komórek oraz niektórych struktur i substancji wydzielanych przez komórki podczas kontaktu z węglowodorami	• Komórki gęsto pokryte fimbriami, duża liczba struktur przypominających flagelle/pilie, obecność egzopolisacharydów	heksadekan	*P. aeruginosa*	[69]
		• Adhezja i sklejanie się komórek tworzących biofilm, produkcja zewnątrzkomórkowych bioflokulantów	wody złożowe z odwiertów	*Pseudomonas aeruginosa* IASST201	[71]
		• Obecność ciałek inkluzyjnych i przyłączanie bakterii do powierzchni kropli węglowodorów, krople heksadekanu pokryte warstwą o zwiększonej gęstości elektronowej, przechodzącą na przyłączone komórki mikrooganizmów, obecnosć kropli węglowodorów wewnątrz komórek	heksadekan	*Pseudomonas aeruginosa* SSC2	[73]
		• Produkcja egzopolisacharydów	toluen	*Rhodococcus*	[70]
		• Obserwacja adhezji komórek w obecności węglowodorów na skutek zwiększonego wydzielania egzopoliemrów	woda zęzowa ze statków	*P. putida* PA1 and *Alcanivorax* sp. PA2	[72]
		• Obecność pęcherzyków błonowych, zwierających w środku węglowodory	kanamycyna, ampicylina, chloramfenikol	*E. coli*	[91]

Tabela I. 3. Zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami

Cecha	Funkcja	Modyfikacje cechy	Źródło węgla	Szczep bakteryjny	Lit.
		• Eliminacja cząsteczek toluenu przez wydzielanie pęcherzyków membranowych, zmniejszenie ilości cząstek toluenu przyłączonych do powierzchni komórek	toluen	*P. putida* IH-2000	[74]
		• Obecność watrswy o podwyższonej gęstości elektronowej na powierzchni komórek, emulsyfikacja cząstek zanieczyszczeń z udziałem biosurfaktantu, zwiększenie powierzchni kontaktu komórek z zanieczyszczeniami	zużyty olej silnikowy	Bakterie glebowe	[78]
		• Komórki krótsze, o wygładzonej powierzchni, przy stężeniu oktadecanu 400 mg/l obserwowano przerwanie ciągłości błony komórkowej, warstwa o podwyższonej gęstości elektronowej na powierzchni komórek, utrzymanie żywotności komórek pomimo zmian morfologicznych	oktadekan	*Pseudomonas* sp. DG17	[79]
		• Akumulacja ksenobiotyków wewnątrz komórek, w ciałkach inkluzyjnych w hodowlach z: o oktadekanem o heksadekanem o heksadekanem, oktadekanem i pristanem	oktadekan heksadekan	*Pseudomonas* sp. DG17 *Pseudomonas synxantha* LSH-7′	[76] [75]

Tabela I. 3. Zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami

Cecha	Funkcja	Modyfikacje cechy	Źródło węgla	Szczep bakteryjny	Lit.
			heksadekan, oktadekan, pristan	*Rhodococcus erythropolis* S+14He	[77]
		• Komórki w hodowli z toluenem były o 8,5% dłuższe niż w próbie kontrolnej	toluen	*Pseudomonas stutzeri* ST-9	[81]
		• Redukcja współczynnika wielkości powierzchni do objętości komórek, wygładzenie powierzchni komórek	fenol, 4-chlorofenol	*Pseudomonas putida* P8, *Enterobacter* sp. VKGH12	[80]
Hydrofobowość powierzchni komórek	Hydrofobowość powierzchni jest jedną z cech warunkujących bezpośredni kontakt komórek z zanieczyszczeniami i ich przyłączenie do powierzchni bakterii	• Wzrost wartości CSH po dodaniu węglowodorów, największy dla podłoża z dodatkiem długołańcuchowych alkanów i węglowodoró○ aromatycznych	węglowodory alifatyczne i aromatyczne	*Stenotrophomonas maltophilia*	[87]
		• Wzrost wartości CSH na podłożu z olejem napędowym i węglowodorami aromatycznymi	olej napędowy, węglowodory aromatyczne	*Aeromonas hydrophila*	[92]
		• Wzrost wartości CSH wraz z wydłużaniem łańcucha aliklowego, wyższe wartości hydrofobowości dla komórek na podłożu z mieszaniną długołańcuchowych węglowodorów, niewielka hydrofobowość komórek na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych	węglowodory alifatyczne, aromatyczne i ich mieszaniny	*Paenibacillus* sp. D9	[88]

Tabela I. 3. Zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami

Cecha	Funkcja	Modyfikacje cechy	Źródło węgla	Szczep bakteryjny	Lit.
		• Wyższe wartości CSH dla komórek o większym potencjale biodegradacyjnym (*Bacillus licheniformis, Bacillus cereus*), ale dobre efekty osiągane również przez komórki o umiarkowanie hydrofobowej powierzchni (*Pseudomonas amylolitycus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus simplex*)	ropa naftowa	46 izolatów bakteryjnych z gleby i wód Kuwejtu	[37]
		• Wzrost wartości CSH w czasie hodowli na podłożu z alkanami	alkany	*Rhodococcus erthropolis*	[93]
		• Wzrost wartości CSH wraz ze wzrostem stężenia *p*-nitrofhenolu	*p*-nitrofenol	*Rhodococcus* sp. CN6	[85]
		• Wyższe wartości CSH dla komórek wzrastających na podłożu z dodatkiem lekkiej frakcji węglowodorów niż ciężkiej frakcji	ropa naftowa	*Rhodococcus ruber* UKMP-10M2	[86]
		• Wzrost wartości CSH do wartości umiarkowanych i wysokich w hodowli z węglowodorami	heksadekan, olej napędowy	*Exiguobacterium aurantiacum*, *Burkholderia cepacia*	[94]
		• Wzrost wartości CSH w bioreaktorach z dodatkiem oleju silikonowego lub HMN	olej silikonowy, HMN	*P. aeruginosa*, *P. putida*	[95]
		• Wzrost wartości CSH aż do obecności toksycznego stężenia chinoliny i pirydyny w podłożu, wartości CSH najwyższe na podłożu z dodatkiem chinoliny i pirydyny w stężeniu 500 i 1000 mg/l	chinolina, pirydyna	*Chryseobacterium* sp	[84]

Tabela I. 3. Zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami

Cecha	Funkcja	Modyfikacje cechy	Źródło węgla	Szczep bakteryjny	Lit.
		• Wyższe wartości CSH dla komórek o wyższym potencjale degradacyjnym	ropa naftowa, heksadekan, fenetren	*P. aeruginosa*	[90]
		• Fluktuacje wartości CSH w zależności od fazy wzrostu komórek i podłoża hodowlanego	fenetren	*Pseudomonas sp*. PP2	[82]
		• Wzrost wartości CSH aż do obecności toksycznego stężenia heksadekanu, dodekanu, heksanu i metylobenzenu, najwyższe wartości CSH uzyskano dla hodowli z dodatkiem długołańcuchowych węglowodorów alifatycznych	heksadekan, dodekan, heksan i metylobenzen	*Pesudomonas* sp. SWP-4	[89]
		• Umiarkowany wzrost wartości CSH podczas degradacji pirenu	piren	*A. denitrificans* ASU-035	[96]
		• Wzrost wartości CSH wraz ze wzrostem stężenia asfaltanów	asfaltany	*Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa*	[83]
		• Różnice w wartości hydrofobowości powierzchni komórek w zależności od tego, z którego pasażu były pobierane do analiz	heksadekan	*Pseudomonas aeruginosa*	[69]
		• Wartość hydrofobowości powierzchni jest związana z wydzielaniem zewnątrzkomórkowym pęrzechyków błonowych, EPS i biosurfaktantów	długołańcuchowe alkohole, stres osmotyczny, dodatek EDTA, stres cieplny	*Pseudomonas putida* DOT-T1E	[36]

Tabela I. 3. Zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami

Cecha	Funkcja	Modyfikacje cechy	Źródło węgla	Szczep bakteryjny	Lit.
Potencjał elektrokinetyczny (potencjał ζ)	Potencjał elektrokinetyczny warstwy elektronowej na granicy poślizgu komórki zawieszonej w roztworze, będący wynikiem ekspozycji na powierzchni bakterii grup fosforylowych i karboksylanowych (w bakteriach gram-ujemnych reprezentowanych głównie przez składniki LPS) zapewnia utrzymanie prawidłowego funkcjonowania komórek oraz pozwala określić stan błony komórkowej oraz zdolności cząstek do agregacji	• Fluktuacje wartości potencjału w zależności od źródła węgla w hodowli i siły jonowej buforu	heksadekan, naftalen, fenantren piren	*Burkholderia cepacia*-ES1, *Burkholderia multivorans*-HN1, *Burkholderia multivorans*-NG1	[38]
		• Obniżenie potencjału elektrokinetycznego komórek hodowanych na podłożu z mieszaniną dodekanu i heksadekanu oraz z dodatkiem oleju napędowego	mieszanina dodekanu i heksadekanu, olej napędowy	*P. aeruginosa* Pa 10 TK, *P. aeruginosa* Pa 2 KM, *P. aeruginosa* Pa 3 KM	[97]
		• Zależność wartości potencjału elektrokinetycznego od wykorzystywanego źródła węgla, najniższe wartości odnotowano dla komórek rosnących na podłożu z *izo*butylobenzenem i ramnolipidami oraz butylobenzenem i ramnolipidami	butylobenzen, *sec*-butylobenzen, *tert*-butylobenzen, *izo*butylobenzen	*Pseudomonas stutzeri*	[98]
		• Potencjał elelktrokinetyczny komórek w hodowli z dodatkiem heksadekanu, antracenu i naftalenu obniżył się znacząco po dodaniu CTAB	heksadekan, antracen, naftalen	*Pseudomonas* sp. RW-II	[99]
		• Niewielkie fluktuacje potencjału dzeta komórek z próby kontrolnej po przeniesieniu na podłoże z heksadekanem lub olejem napędowym, znaczące zmiany w przypadku komórek przeniesionych z podłoża z olejem napędowym na heksadekan	heksadekan, olej napędowy	*Achromobacter sp.* 4(2010)	[100]

Tabela I. 3. Zmiany wybranych właściwości mikroorganizmów pod wpływem kontaktu z węglowodorami

Cecha	Funkcja	Modyfikacje cechy	Źródło węgla	Szczep bakteryjny	Lit.
		• Niewielkie różnice potencjału dzeta między komórkami hodowanymi na podłożu z dodatkiem fenetrenu i fluorenu, komórki o zdecydowanie niższym potencjale elektrokinetycznym niż w próbie kontrolnej	fluoren, fenantren	*Pseudomonas putida* ATCC 17514	[101]
Agregacja komórek	Bioflokulacja i agregacja komórek oraz węglowodorów przez wydzielane zewnątrzkomórkowo bioflokulanty	• Produkcja bioflokulantu wspiera proces degradacji długołańcuchowych alkanów	długołańcuchowe alkany	*Rhodococcus erythropolis* NTU-1	[102]
		• Flokulacja bakterii podczas wzrostu na podłożu z dodatkiem węglowodorów, wsparcie procesów degradacyjnych	heksadekan i pristin	*Rhodococcus* NTU-1	[103]
		• Produkcja bioflokulantu przez bakterie wzrastające na podłożu z ropą naftową	ropa naftowa	*Pseudomonas aeruginosa* IASST201	[104]
		• Produkcja bioflokulantu zapobiegała flokulacji i emulsyfikacji WWA	WWA	*Pseudomonas marginalis*	[105]

CEL I ZAKRES PRACY

Dokonany przegląd literatury wskazał na znaczną toksyczność węglowodorów ropopochodnych oraz ich negatywny wpływ na środowisko naturalne, wskazując także na wysoki potencjał mikroorganizmów w usuwaniu tego rodzaju zanieczyszczeń. Jednocześnie stwierdzono, że mechanizmy przemian zachodzących w komórkach eksponowanych na szkodliwe działanie ksenobiotyków i zdolnych do ich rozkładu nie są dobrze poznane. Przeprowadzenie badań w tym zakresie pozwoli na znaczące wzbogacenie wiedzy o właściwościach mikroorganizmów degradujących węglowodory oraz możliwości indukowania przemian komórkowych w celu zwiększenia efektywności biodegradacji związków aromatycznych i alifatycznych. Celem podjętych badań było określenie wpływu zanieczyszczeń węglowodorowych (mieszaniny węglowodorów aromatycznych: butylobenzenu, propylobenzenu, *tert*-butylobenzenu, *sec*-butylobenzenu i ksylenu; mieszaniny węglowodorów alifatycznych: *izo*oktanu, nonanu, dodekanu, tridekanu i heksadekanu; lub oleju napędowego) na modyfikacje komórek związane z adaptacją mikroorganizmów do biodegradacji związków aromatycznych i alifatycznych w warunkach tlenowych. Cel pracy obejmował również analizę zmian zdolności degradacyjnych testowanych mikroorganizmów oraz możliwości ich wykorzystania w bioremediacji zanieczyszczeń olejem napędowym w środowisku. Badania realizowano z wykorzystaniem wyizolowanych z próbek środowiskowych szczepów bakteryjnych, a także z wykorzystaniem konsorcjum mikroorganizmów autochtonicznych zawartych w wodzie jeziornej. Cel badań realizowano poprzez wykonanie czterech głównych zadań badawczych:

1. Izolację z próbek środowiskowych oraz charakterystykę mikroorganizmów zdolnych do wzrostu na podłożu zawierającym olej napędowy.
2. Ekspozycję komórek przez 12 miesięcy na: mieszaninę węglowodorów aromatycznych, mieszaninę węglowodorów alifatycznych lub olej napędowy, i określenie wpływu tej ekspozycji na właściwości powierzchniowe wyizolowanych szczepów bakteryjnych.
3. Analizę zmian zdolności biodegradacyjnych komórek bakteryjnych zachodzących w wyniku ekspozycji na węglowodory.
4. Ocenę możliwości wykorzystania testowanych szczepów w usuwaniu zanieczyszczeń węglowodorowych z próbek wodnych.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Odczynniki i aparatura

Spis odczynników oraz aparatury wykorzystywanych podczas badań został zaprezentowany w Tabelach II. 1 oraz II. 2.

Tabela II. 1. Spis odczynników wykorzystywanych do badań

Odczynnik	Producent
2-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd	Sigma Aldrich, Niemcy
agar – agar	BTL sp. z o.o., Polska
agar wzbogacony	BTL sp. z o.o., Polska
azotan(V) wapnia(II) 7 hydrat cz.d.a.	POCH, Polska
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone
bromek 3,8-diamino-N-etylo-6-fenylo-fenantrydyny	Sigma Aldrich, Niemcy
bulion odżywczy	BTL sp. z o.o., Polska
bursztynian sodu(I) 7 hydrat cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy
butylobenzen	Sigma Aldrich, Niemcy
chlorek kobaltu(II) 6 hydrat cz.d.a.	POCH, Polska
chlorek manganu(II) 4 hydrat cz.d.a.	POCH, Polska
chlorek miedzi(II) 2 hydrat cz.d.a.	POCH, Polska
chlorek niklu(II) 2 hydrat cz.d.a.	Chempur, Polska
chlorek sodu(I) cz.d.a.	Chempur, Polska
cytrynian amonu żelaza(III) cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy
diwodorofosforan(V) potasu(I) cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy
diwodorofosforan(V) sodu(I) cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy
ditiotreitol ≥99.0%	Sigma Aldrich, Niemcy
dodekan cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy
eter *tert*-butylowo-metylowy	POCH, Polska
etylobenzen	Sigma Aldrich, Niemcy
fiolet krystaliczny	POCH, Polska
GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma Aldrich, Niemcy
Glutathione-S-Transferase (GST) Assay Kit	Sigma Aldrich, Niemcy
glukoza cz.d.a.	POCH, Polska
heksan cz.d.a.	POCH, Polska
heksadekan cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy

Tabela II. 1. Spis odczynników wykorzystywanych do badań

Odczynnik	Producent
*izo*oktan cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
jodoacetamid	Sigma Aldrich, Niemcy
kwas borowy cz.d.a.	POCH, Polska
kwas chlorowodorowy 35-38%, cz.d.a.	POCH, Polska
kwas siarkowy(VI) 98%	POCH, Polska
ksyleny (mieszania izomerów ≥98,5%) cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
nonan cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
metanol cz. d. a.	POCH, Polska
molibdenian(VI) sodu(I) 2 hydrat cz.d.a.	POCH, Polska
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Stany Zjednoczone
pirokatechol cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
propylobenzen cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Niemcy
sec-butylobenzen cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
siarczan(VI) amonu cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy
siarczan(VI) cynku(II) 7 hydrat cz. d. a.	POCH, Polska
siarczan(VI) magnezu(II) cz.d.a. hydrat	POCH, Polska
Taq Buffer without detergents	Thermo Fischer Scientific, Stany Zjednoczone
Taq DNA Polymerase (recombinant)	Thermo Fischer Scientific, Stany Zjednoczone
tert-butylobenzen cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
tetradekan cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
trypsyna z trzustki wieprzowej cz. d. a.	Sigma Aldrich, Niemcy
wodorofosforan(V) di-sodu(I) cz.d.a.	Sigma Aldrich, Niemcy
wodorotlenek sodu(I) cz.d.a.	Chempur, Polska
wodorowęglan amonu cz. d. a.	POCH, Polska
Vitek®ID cards	Biomerieux, Polska

Tabela II. 2. Spis aparatury i sprzętu wykorzystywanych do badań

Nazwa	Model/Typ	Producent
analizator genetyczny	AbiPrism® 3100	Applied Biosystem, Stany Zjednoczone
analizator potencjału dzeta	Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments Ltd., Wielka Brytania
automatyczny system do identyfikacji (ID) i określania lekowrażliwości (AST) drobnoustrojów	Vitek 2	Biomerieux, Polska
aparat do otrzymywania wody ultraczystej	Arium® pro ASTM Typ 1	Sartorius Stedim Biotech SA, Polska
autoklaw elektryczno – parowy	typ A6	SMS Spółdzielnia Pracy Mechaników, Polska
chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas	Pegasus 4D GCxGC–TOF MS	Leco, Stany Zjednoczone
chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym	HP6890	Hewlett-Packard, Stany Zjednoczone
chromatograf cieczowy	Dionex Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone
homogenizator ultradźwiękowy	Sonopuls HD 3100	Bandelin, Niemcy
inkubator z wytrząsaniem	KS 4000 ic control	IKA Werke GmbH, Niemcy
komora laminarna	Labculture Class II Type A2	ESCO Micro Pte. Ltd., Singapur
łaźnia wodna	MultiTemp III	Amersham Biosiences GE Healthcare, Stany Zjednoczone
pH–metr laboratoryjny	1000 L, pHenomenal®	VWR, Polska
piec komorowy	AWF 15/5	Lenton, Wielka Brytania
spektrofotometr UV–Vis	V–650	Jasco Inc, Japonia
system do wizualizacji żeli	GelDoc ItImaging System	UVP, Stany Zjednoczone
termocykler	Mastercycler ep. Gradient 5341	Eppendorf, Niemcy
transmisyjny mikroskop elektronowy	JEM-1200EXII Electrone Microscopy	JEOL, Stany Zjednoczone
wirówka z chłodzeniem	3–18K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Niemcy
wytrząsarka laboratoryjna typu Vortex	Infrared Vortex Mixer – WIZARD	VELP Scientifica, Włochy
wysokorozdzielczy spektrometr masowy	Q-Exactive Orbitrap	Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone

2. Przygotowanie szkła i roztworów do badań

2.1. Sterylizacja

Szkło laboratoryjne oraz materiały trwałe, odporne na wysoką temperaturę sterylizowano w sterylizatorze suchym, gorącym powietrzem, w temperaturze 180°C przez 40 min. Materiały zużywalne, przybory oraz inne elementy wyposażenia nieodporne na wysoką temperaturę jałowiono w autoklawie parą wodną, w temperaturze 121°C, przez

15 min, przy nadciśnieniu 1 atm. Po zakończeniu pracy z mikroorganizmami powierzchnię blatów dezynfekowano środkami dezynfekcyjnymi na bazie alkoholu.

2.2. Przygotowanie wody

Wszystkie roztwory wodne, o ile nie wskazano inaczej, przygotowywano na bazie wody ultra czystej, o oporności 18 MΩ/cm, oczyszczanej z wykorzystaniem aparatu Sartorius Arium Pro ASTM typ I.

2.3. Medium hodowlane i suplementy do powadzenia hodowli

Medium mineralne (MSM) wykorzystywane do prowadzenia hodowli przygotowano zgodnie z danymi literaturowymi [106]. Skład medium oraz roztworu mikroelementów został przedstawiony w Tabelach II. 3 oraz II. 4.

Tabela II. 3. Skład medium hodowlanego

Odczynnik	Stężenie [g/l]
wodorofosforan(V) disodu(I)	2,79
diwodorofosforan(V) potasu(I)	1,00
siarczan(VI) amonu	1,00
siarczan(VI) magnezu(II) 1 hydrat	0,20
azotan(V) wapnia(II) 7 hydrat	0,01
cytrynian amonu żelaza(III)	0,01
roztwór mikroelementów	1,00 ml

Tabela II. 4. Skład roztworu mikroelementów

Odczynnik	Stężenie [g/l]
kwas borowy	0,30
chlorek kobaltu(II) 6 hydrat	0,20
siarczan(VI) cynku(II) 7 hydrat	0,10
molibdenian(VI) sodu(I) 2 hydrat	0,03
chlorek manganu(II) 4 hydrat	0,03
chlorek niklu(II) 2 hydrat	0,02
chlorek miedzi(II) 2 hydrat	0,01

Medium sterylizowano w autoklawie, parą wodną, w temperaturze 121°C, przez 15 min, przy nadciśnieniu 1 atm. Przedstawione medium wykorzystywano do prowadzenia

hodowli płynnych w celu analiz właściwości powierzchniowych komórek oraz prób biodegradacyjnych w układach modelowych.

Wykorzystywane jako źródło węgla 20% roztwory bursztynianu sodu i glukozy przygotowano poprzez rozpuszczenie w wodzie dejonizowanej 20 g naważki odpowiedniego związku. Bulion wzbogacony oraz agar wzbogacony wykorzystywane do namnożenia mikroorganizmów przed założeniem hodowli sporządzono zgodnie z zaleceniami producenta (30 g na 1000 ml roztworu), natomiast podłoże agar-agar przygotowywano poprzez rozpuszczenie 15 g proszku w 1000 ml roztworu.

Badania prowadzono wykorzystując jako główne źródło węgla w hodowlach mieszaninę węglowodorów aromatycznych (oznaczenie *AR*) lub alifatycznych (oznaczenie *AL*) o zdefiniowanym składzie, lub olej napędowy (oznaczenie *ON*). Do przygotowania mieszanin węglowodorów użyto odpowiednio (w proporcjach 1:1:1:1:1):

AR: butylobenzenu, propylo-benzenu, *tert*-butylobenzenu, *sec*-butylobenzenu i ksylenu;

AL: *izo*oktanu, nonanu, dodekanu, tridekanu i heksadekanu

Przed użyciem wszystkie roztwory przefiltrowano przez jałowy filtr 0,2 μm.

Podłoże agar-agar wykorzystywane do przechowywania mikroorganizmów przygotowano poprzez rozpuszczenie 7,5 g proszku w 500 ml medium MSM. Następnie podłoże sterylizowano na mokro w autoklawie (121°C, 15 min, 1 atm) i rozlewano na gorąco na płytki Petriego w komorze z przepływem laminarnym. Po zestaleniu podłoża na jego powierzchni za pomocą głaszczki na każdej płytce rozprowadzano po 100 μl mieszaniny węglowodorów lub oleju napędowego. Tak przygotowane podłoża zaszczepiano mikroorganizmami z hodowli płynnej, inkubowano 14 dni w temp. 22°C, a następnie pasażowano na świeże podłoże.

Równolegle do komórek poddawanych ekspozycji na węglowodory, na podłożu stałym składającym się z agaru wzbogaconego utrzymywane i pasażowane w tych samych odstępach czasowych były odpowiadające im szczepy kontrolne.

Bufor fosforanowo-sodowy przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta, rozpuszczając odważoną ilość proszku w wodzie destylowanej. Po rozpuszczeniu, skontrolowano pH roztworu i w razie potrzeby uregulowano do wartości 7,4.

3. Izolacja i charakterystyka szczepów bakteryjnych

3.1. Izolacja mikroorganizmów

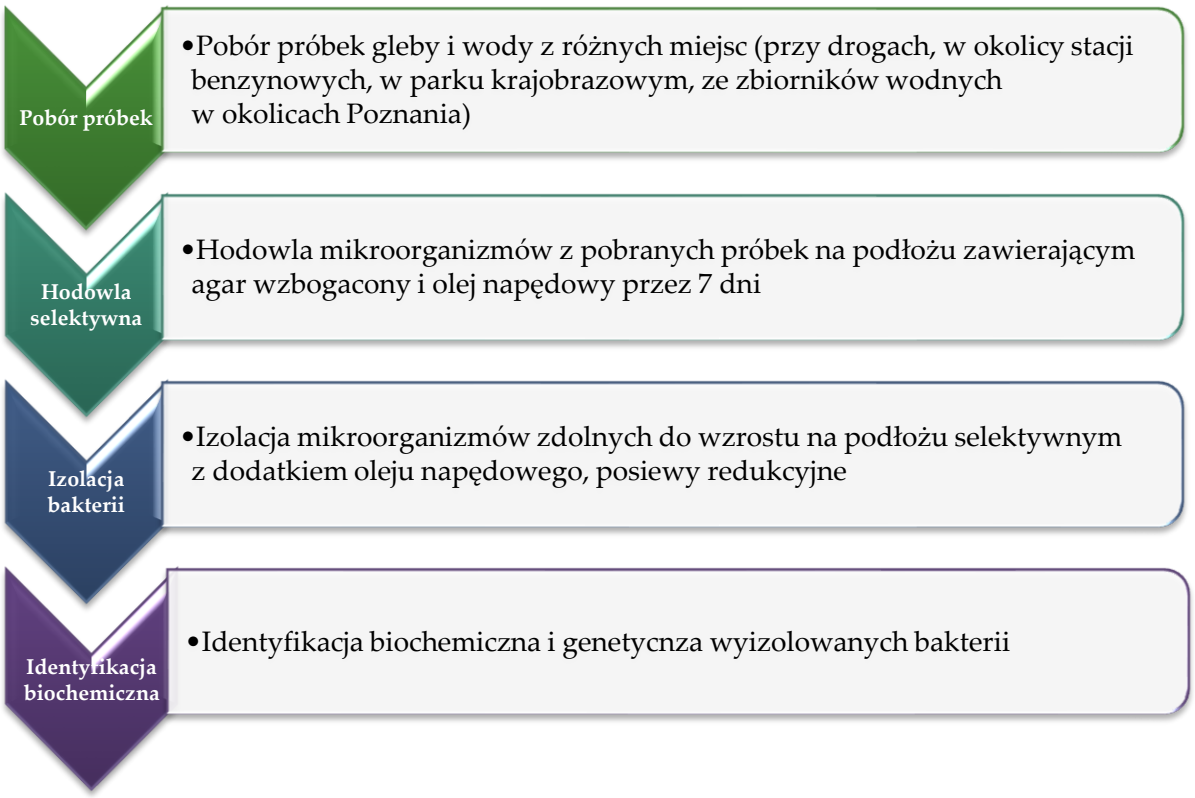
Mikroorganizmy do badań pozyskiwano z próbek środowiskowych (gleba pobrana z różnych terenów). Próbki gleby pobierane były z powierzchni oraz z głębokości 30 cm, pakowane w sterylne pojemniki transportowe, a następnie transportowane do laboratorium w warunkach chłodniczych w ciągu 6 h od pobrania. Wykaz pobranych prób wraz z miejscem ich pochodzenia został przedstawiony w Tabeli II. 4.

Tabela II. 4. Wykaz pobranych próbek środowiskowych z uwzględnieniem miejsca ich pobrania oraz liczby wyizolowanych mikroorganizmów

Źródło mikroorganizmów	Współrzędne GPS miejsca poboru próbek	Liczba wyizolowanych mikroorganizmów*	Symbole wyizolowanych szczepów
Gleba z terenu stacji benzynowej	52°46.6849′ N, 16°67.2419′ E	4	M01, M02-1, M03-1, M03
Gleba przy drodze	52°34.2932′ N, 16°99.9969′ E	2	M01-2, M02-2
Gleba z parku krajobrazowego	53°12.3656′ N, 15°98.9707′ E	1	M1D
Gleba na brzegu jeziora	52°43.2128′ N, 16°68.9646′ E	2	M1B, M2B

* liczba mikroorganizmów zdolnych do wzrostu na podłożu selektywnym z dodatkiem oleju napędowego

Po przewiezieniu próbek do laboratorium naważkę z każdej z nich o masie 10 g zawieszano w 100 ml jałowego bulionu wzbogaconego. Po 24h inkubacji w temp. 22°C zawiesinę odwirowywano przy prędkości 4500 *g*, przemywano dwukrotnie jałowym medium hodowlanym i zawieszano w 50 ml sterylnego medium z dodatkiem 1 ml 20% roztworu bursztynianu sodu oraz 100 µl mieszaniny węglowodorów aromatycznych, alifatycznych lub oleju napędowego (przygotowanych zgodnie z opisem w rozdziale 2.3, część III) (Rysunek II. 1).



Rysunek II. 1. Schemat procesu izolacji i charakterystyki mikroorganizmów z próbek środowiskowych

Hodowle pasażowano na świeże podłoża co 7 dni, stopniowo zmniejszając ilość dodawanego roztworu bursztynianu sodu na rzecz węglowodorów. W wyniku prowadzonych hodowli selektywnych, po 9 tygodniach jedynym źródłem węgla były odpowiednio węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy w stężeniu 20 ml/l. Mikroorganizmy utrzymywano na tym podłożu płynnym przez kolejne 2 tygodnie, a następnie przeniesiono je na podłoże stałe, przygotowane zgodnie z opisem w rozdziale 2.3 (część II). Równolegle, wyselekcjonowane bakterie przeniesiono na 24 h na podłoże z agarem wzbogaconym, a następnie wykonano posiewy redukcyjne w celu wyizolowania pojedynczych kolonii.

Ekspozycję wyselekcjonowanych mikroorganizmów na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy prowadzono przez kolejnych 12 miesięcy, przenosząc bakterie na świeże podłoże co 14 dni. Dodatkowo, co miesiąc przenoszono mikroorganizmy na 7 dni do hodowli płynnej składającej się z 50 ml medium hodowlanego, 150 µl roztworu mikroelementów, 1 ml mieszaniny odpowiednich węglowodorów lub oleju napędowego oraz

100 μl 20% roztworu bursztynianu sodu w celu ich namnożenia i pozyskania biomasy do dalszych analiz.

3.2. Charakterystyka wody jeziornej

Próbki wody jeziornej pobrano z dwóch zbiorników słodkowodnych: jezioro na terenie Drawieńskiego Parku Narodowego, przy Rezerwacie Wydrowe Łęgi (W1, lokalizacja GPS: 53°15.5603' N, 16°04.1650' E) oraz Jeziora Kierskiego (W2, lokalizacja GPS: 52°42.3307' N, 16°88.7421' E). Zbiorniki te zostały wybrane ze względu na ich duże zróżnicowanie pod względem odległości od terenów miejskich, sposobu zagospodarowania terenów wokół zbiorników oraz sposobu użytkowania jezior. Pobrane próbki wody scharakteryzowano pod kątem zawartości masy organicznej, suchej masy, suchej masy organicznej, pH (z wykorzystaniem pH-metru) oraz ilości występujących mikroorganizmów.

Aby określić ilość masy organicznej obecnej w badanych próbkach wody, do probówek wirówkowych odmierzono 20 ml badanej wody (W1 lub W2), próbki zważono, a następnie odwirowano przy prędkości 4500 *g* przez 15 min. Po zlaniu supernatantu zważono pozostałą po odwirowaniu masę organiczną.

Pomiary suchej masy (SM) oraz suchej masy organicznej (SMO) w próbkach przeprowadzono w wyprażonych wcześniej tyglach porcelanowych. Tygle z próbkami umieszczono w piecu w temperaturze 350°C na 1 h (w celu odparowania wody i uzyskania suchej masy). Po wystygnięciu tygle ważono, a następnie przenoszono powtórnie do pieca, gdzie wyprażano je w temperaturze 600°C przez 2 h. Po upływie wyznaczonego czasu i wystygnięciu tygle ważono i określano zawartość suchej masy (W1) i suchej masy organicznej (W2) w próbce zgodnie ze wzorem:

Zawartość suchej masy (W1):

$$\%SM = \frac{m_{350°C} - m_t}{m_n \times 100} \qquad \text{(W1)}$$

gdzie: $\%\boldsymbol{SM}$ – zawartość suchej masy w próbce [%]; $\boldsymbol{m_{350°C}}$ – masa tygli porcelanowych z naważką po suszeniu [g]; $\boldsymbol{m_t}$ – masa tygli porcelanowych [g]; $\boldsymbol{m_n}$ – masa naważki [g]

Zawartość suchej masy organicznej (W2):

$$\%\, SMO = \frac{m_{350°C} - m_{600}}{m_n \times 100} \qquad \text{(W2)}$$

gdzie: % $\boldsymbol{SMO}$ – zawartość suchej masy organicznej [%]; $\boldsymbol{m_{350^{\circ}C}}$ – masa tygli porcelanowych z naważką po suszeniu [g]; $\boldsymbol{m_{600}}$ – masa tygli porcelanowych z naważką po prażeniu [g]; $\boldsymbol{m_n}$ – masa naważki [g].

W celu określenia miana hodowli wykorzystano metodę seryjnych rozcieńczeń. Do jałowych, ponumerowanych probówek szklanych o pojemności 10 ml rozlano po 9 ml roztworu soli fizjologicznej (0,85% NaCl), dodano 1 ml odpowiedniej wody pobranej z jeziora (W1 lub W2), a następnie dokładnie wymieszano. Do kolejnej probówki przeniesiono 1 ml rozcieńczonej wody z probówki 1 i ponownie dokładnie wymieszano. W ten sposób dla każdej badanej wody otrzymano rozcieńczenia 1:1, 1:10, 1:100 i 1:1000. Z każdego uzyskanego rozcieńczenia pobierano 0,1 ml zawiesiny bakterii, przenoszono na podłoże agarowe, a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 22°C. Po upływie doby dokonywano obserwacji oraz liczono pojedyncze kolonie w celu określenia ilości mikroorganizmów w próbkach wody według wzoru (W3):

$$N = \frac{n}{(10^R \times V)} \qquad \text{(W3)}$$

gdzie: $\boldsymbol{N}$ - miano hodowli bakteryjnej (liczba bakterii w 1 ml) [1⁄ml]; $\boldsymbol{n}$ – liczba kolonii, które wyrosły na płytce przy danym rozcieńczeniu; $\boldsymbol{10^R}$ – rozcieńczenie hodowli; $\boldsymbol{V}$ - objętość wysianej próby [ml].

3.3. Określenie profilu biochemicznego mikroorganizmów

Analizy profili biochemicznych wyselekcjonowanych mikroorganizmów przeprowadzono z wykorzystaniem systemy Vitek®2. Zawiesinę komórek każdego z wyizolowanych szczepów wprowadzano do karty Vitek®2 ID card, wkładano do komory napełniającej a po napełnieniu przenoszono do komory inkubacyjnej, gdzie odbywała się inkubacja i odczyt wyników. Karty Vitek®2 ID card składają się z 47 studzienek reakcyjnych zawierających substraty wymagane do identyfikacji biochemicznej mikroorganizmów. Wyniki analizy kolorymetrycznej są opracowywane w oparciu o dedykowaną bazę danych pozwalając na uzyskanie profilu biochemicznego oraz identyfikację bakterii na poziomie gatunkowym. Opisane analizy wykonano w Pracowni Mikrobiologii Wielkopolskiego Centrum Onkologii pod kierunkiem dr hab. n.med. Zefiryna Cybulskiego.

3.4. Identyfikacja genetyczna mikroorganizmów

Wyselekcjonowane szczepy mikroorganizmów poddano analizie genetycznej w celu ich dokładnej identyfikacji i określenia pokrewieństwa filogenetycznego. W pierwszym etapie przeprowadzono izolację materiału genetycznego z użyciem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy), a następnie amplifikację bakteryjnego regionu 16S rRNA z wykorzystaniem starterów 8F (5′ AGTTTGATCATCGCTCAG 3') i 1492R (5′ GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). Amplifikację przeprowadzono w następujących warunkach: 94°C przez 300 s, 3 cykle: 94°C (45 s), 57°C (30 s), 72°C (120 s); 3 cykle: 94°C (45 s), 56°C (30 s), 72°C (120 s); 3 cykle: 94°C (45 s), 55°C (30 s), 72°C (120 s); 26 cykli: 94°C (45 s), 53°C (30 s), 72°C (120 s) na końcu utrzymując temperaturę 72°C przez 300s. Sekwencjonowanie nukleotydów przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu: Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, Stany Zjednoczone) i analizatora AbiPrism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Stany Zjednoczone). Homologi uzyskanych sekwencji wyszukiwano w programie MegaBLAST ze standardowymi ustawieniami, a drzewo pokrewieństwa filogenetycznego sporządzono na bazie wielokrotnego przyporządkowania sekwencji w programie CLC Free Workbench 4.5.1 (QIAGEN Bioinformatics, Niemcy) [107]. Sekwencje genu 16S rRNA poszczególnych szczepów oraz ich nazwy gatunkowe zostały zgłoszone do bazy GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, Stany Zjednoczone), a badania zostały przeprowadzone w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr hab. Urszuli Guzik.

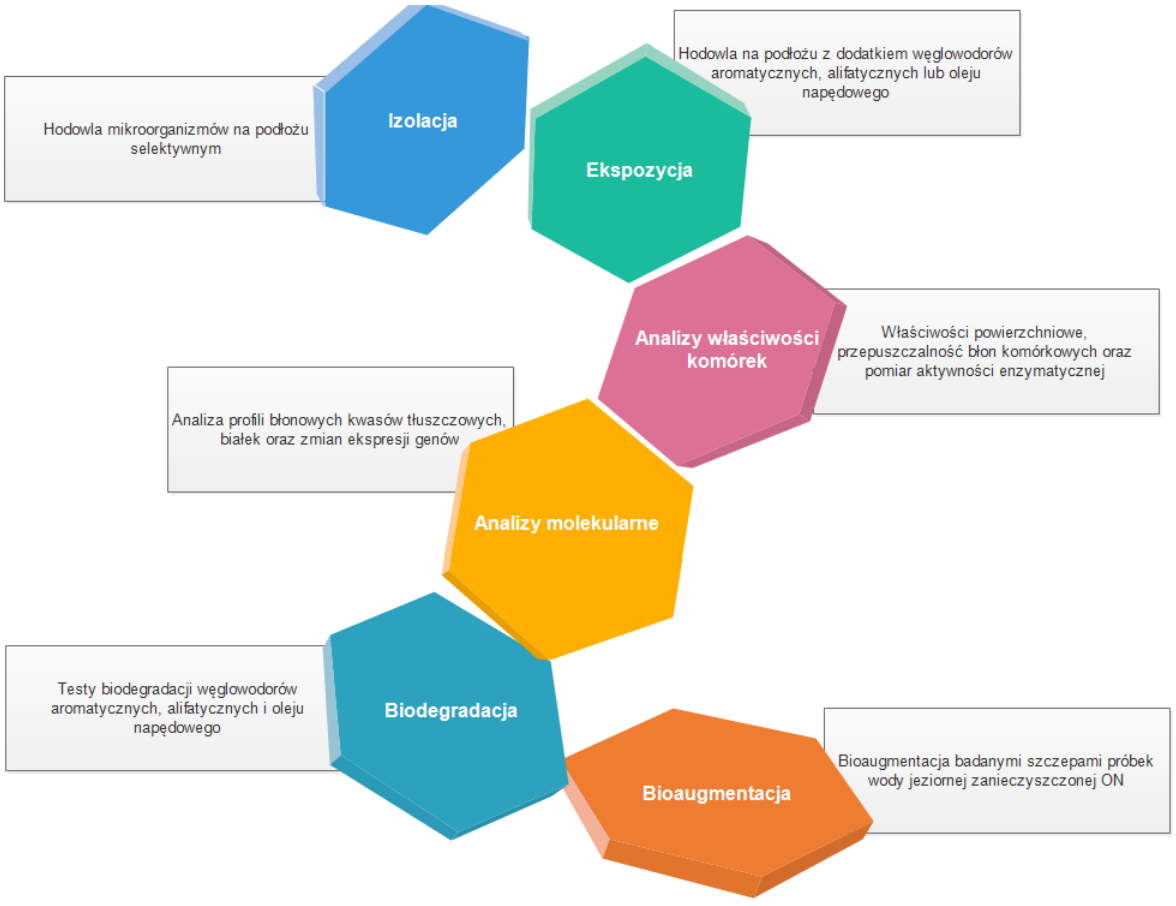
3.5. Ekspozycja komórek na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy

W celu określenia wpływu zanieczyszczeń węglowodorowych na komórki wyizolowanych szczepów w kolejnych etapach prac wykorzytsywano dwie linie komórkowe dla każdego z badanych szczepów – komórki nieeksponowane (NE) oraz eksponowane (E) (Rysunek II. 2):

- komórki nieeksponowane (**NE**) – utrzymywane były przez 12 miesięcy na podłożu stałym (agar wzbogacony) i pasażowane na świeże podłoże co 2 tygodnie
- komórki eksponowane (**E**) – utrzymywane były przez 12 miesięcy na podłożu stałym (agar-agar) z dodatkiem odpowiednich węglowodorów: mieszaniny węglowodorów

aromatycznych (AR), mieszaniny węglwoodrów alifatycznych (AL.) lub oleju napędowego (ON). Mikroorganizmy poddawane 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory były pasażowane na świeże podłoże co 2 tygodnie. Okresowo, w czasie 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory, z hodowli pobierane były próbki do analiz hydrofobowości powierzchni komórek oraz potencjału elektrokinetycznego Po każdym pasażu na świeże podłoże mikoorganizmy były inkubowane przez 48-72h w temperaturze 22°C, sprawdzano ich czystość mikrobiologiczną, a następnie przechowywane w lodówce do następnego pasażu.

Po zakończeniu 12-miesięcznego okresu ekspozycji na węglowodory bakterie były przechowywane w stanie zamrożenia (-80°C) oraz w formie liofilizowanej.



Rysunek II. 2. Schemat przeprowadzonych analiz w celu identyfikacji wywołanych ekspozycją na węglowodory zmian właściwości komórek, gdzie: ON – olej napędowy

4. Analiza właściwości powierzchniowych mikroorganizmów

4.1. Przygotowanie komórek do analiz

W celu otrzymania biomasy do badań odpowiednie linie komórkowe były namnażane w hodowli płynnej zawierającej: 50 ml medium hodowlanego (MSM), 150 µl roztworu mikroelementów, bakterie pobrane z odpoiwedniej hodowli na podłożu stałym oraz:

- 1 ml 20% roztworu glukozy – komórki nieeksponowane
- 100 µl odpowiedniej mieszaniny węglowodów aromatycznych (AR), alifatycznych (AL.) lub oleju napędowego (ON) – komórki eksponowane

Komórki w fazie wzrostu logarytmicznego (po około 24-72 h hodowli) odwirowywano przy prędkości 4500 *g* przez 10 min, w temp. 22°C i przemywano dwukrotnie sterylnym medium hodowlanym. Następnie komórki zawieszano w świeżym medium, w objętości pozwalającej na uzyskanie zawiesiny komórek o gęstości optycznej OD_{600}≈1,0.

4.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Zawiesina komórek poddawanych analizom z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego była nakraplana na miedzianą siatkę pokrytą Formvarem/ filmem węglowym. Następnie komórki kontrastowano z zastosowaniem 2% roztworu fosfowolframianu sodu i suszono w temperaturze pokojowej. Analizę mikoroskopową wykonywano na aparacie JEOL JEM-1200EX II Electron Microscope (JEOL, USA) przy napięciu przyspieszającym 80 kV w Wydziałowej Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

4.3. Mikrobiologiczna adhezja do węglowodorów

W celu określenia zmian hydrofobowości powierzchni komórek w wyniku ich ekspozycji na węglowodory przeprowadzono analizy mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów komórek nieeksponowanych (NE) oraz eksponowanych na węglowodory przez 12 miesięcy, bazując na metodzie opisanej przez Rosenberga [108]. Do zawiesiny komórek (patrz sekcja 4.1, część III) dodawano po 100 µl stężonego HCl w celu usunięcia emulsji, wymieszano na worteksie i ponownie zmierzono ich gęstość optyczną (OD_0). Następnie do probówek o objętości 10 ml przenoszono po 5 ml zawiesiny komórek i dodawano 500 µl heksadekanu, wytrząsano intensywnie i pozostawiano na 24 h do

całkowitego rozdziału faz. Po upływie zadanego czasu gęstość optyczną fazy wodnej mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ=600 nm (OD_{24}). Wartości mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów były obliczane na podstawie wzoru (W4).

$$MADW = \left[\frac{OD_0 - OD_{24}}{OD_0}\right] \times 100 \qquad \text{(W4)}$$

gdzie: **OD_0** – gęstość optyczna zawiesiny komórek mierzona przy długości fali 600 nm przed dodaniem heksadekanu [-]; **OD_{24}** - gęstość optyczna fazy wodnej mierzona przy długości fali 600 nm po dodaniu heksadekanu i rozdzieleniu się faz [-]; **MADW** – mikrobiologiczna adhezja do węglowodorów [%]

4.4. Potencjał elektrokinetyczny i rozkład wielkości cząstek

Pomiary wartości potencjału elektrokinetycznego oraz rozkładu wielkości cząstek były wykonywane na aparacie Zetasizer Nano ZS. W celu określenia potencjału dzeta komórek, zawiesinę mikroorganizmów wprowadzano do kuwety pomiarowej z dwoma elektrodami, którą umieszczano następnie w aparacie Zetasizer. Potencjał elektrokinetyczny próbek mierzony był przy stałym pH i obliczany na podstawie równania Smoluchowskiego [109].

Pomiar rozkładu wielkości cząstek zdyspergowanych w cieczy był wykonywany poprzez umieszczenie kuwety spektrofotometrycznej zawierająca 1 ml zawiesiny komórek w aparacie Zetasizer. Rozkład wielkości cząstek tworzących zawiesinę bakteryjną był mierzony w oparciu o metodę dynamicznego rozpraszania światła, a następnie obliczany na podstawie równania Stokesa-Einsteina [109].

4.5. Przepuszczalność błon komórkowych

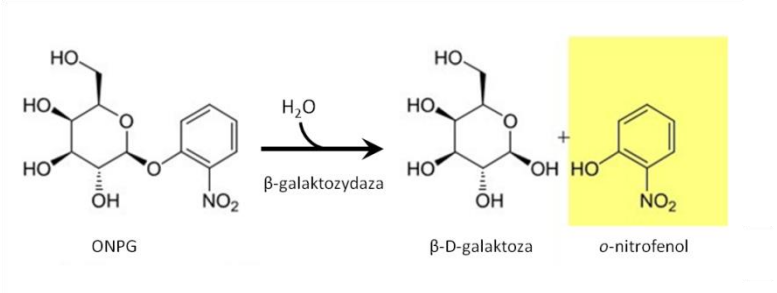
Całkowita przepuszczalność oraz przepuszczalność wewnętrznej błony komórkowej mikroorganizmów eksponowanych oraz nieeksponowanych na węglowodory była wyznaczana z wykorzystaniem fioletu krystalicznego (całkowita przepuszczalność błony komórkowej) [110] lub *orto*-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozydu – ONPG (przepuszczalność wewnętrznej błony komórkowej) [111].

Fiolet krystaliczny (FK) wykazuje niewielką zdolność do penetracji nienearuszonych błon komórkowych, jednak w przypadku uszkodzenia zewnętrznej błony komórkowe jego zdolność do przenikania do wnętrz komórek znacząco wzrasta. Stąd może być on wykorzystywany do spektrofotometrycznej oceny stanu zewnętrznej błony komórek mikroorganizmów, zgodnie ze wzorem (W5) [39]:

$$\% \text{ FK} = \frac{\text{A}_{590} \text{ próbki}}{\text{A}_{590} \text{ roztworu FK}} \qquad \text{(W5)}$$

gdzie: **% FK** – ilość fioletu krystalicznego przenikającego do wnętrza komórek [%] $\mathbf{A_{590}}$ próbki – absorbancja próbki zmierzona przy długości fali λ=590 nm; $\mathbf{A_{590}}$ roztworu FK – absorbancja roztworu fioletu krystalicznego o stężeniu 0,1 mg/ml zmierzona przy długości fali λ=590 nm

Test z wykorzystaniem *orto*-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozydu (ONPG) pozwala na kolorymetryczną ocenę zmian przepuszczalności wewnętrznej błony komórkowej. W wyniku uszkodzeń dwuwarstwy fosfolipidowej na skutek działania czynników stresowych zachodzi translokacja wewnątrzkomórkowego enzymu β-galaktozydazy i uwolnienie go do medium hodowlanego. Do pomiarów ilości uwolnionej β-galaktozydazy wykorzystywany jest odczynnik ONPG, ulegający hydrolizie zachodzącej do barwnego produktu (*orto*-nitrofenol – ONP) (Rysunek II. 3).



Rysunek II. 3. Schemat reakcji β-galaktozydazy z ONPG

Zmierzona przy długości fali λ=415 nm absorbancja ONP jest wykorzystywana do obliczenia stężenia uwolnionej przez komórkę β-galaktozydazy, w oparciu o prawo Lamberta-Beera. Przepuszczalność wewnętrznej błony komórkowej jest następnie obliczana zgodnie ze wzorem (W6):

$$P_{ONPG} = \frac{C}{OD_{600} \times T} \qquad \text{(W6)}$$

gdzie:

$\mathbf{P_{ONPG}}$ – przepuszczalność błony komórkowej wyrażona jako uwolniona β-galaktozydaza [µM ONP/min/ml]; **C** – stężenie uwolnionej przez komórki β-galaktozydazy [mol/l]; $\mathbf{OD_{600}}$ – początkowa absorbancja próbki przy długości fali λ = 600nm [-]; **T** – czas inkubacji próbki z odczynnikiem ONPG [min]

4.6. Aktywność enzymatyczna

Pomiary aktywności enzymatycznej wybranych białek katalitycznych prowadzono dla mikroorganizmów eksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe przez 12 miesięcy. Jako próbę kontrolną wykorzystano mikroorganizmy wzrastające na podłożu z dodatkiem glukozy. Hodowle na podłożach zawierających wybrane węglowodory, olej napędowy lub glukozę przygotowano zgodnie z opisem w pkt. 4.1. Uzyskaną biomasę zawieszono w 5 ml sterylnego medium hodowlanego, przeniesiono do szklanych probówek i przeprowadzano dezintegrację komórek poprzez sonikację (Bandelin SONOPLUS HD 2070), na lodzie, w 5 seriach 30-sekundowych z przerwą 30 s między seriami. Frakcję białkową oddzielono przez wirowanie (10 000 *g*, 50 min, temp. 4°C). Następnie przeprowadzono pomiar aktywności 1,2-dioksygenzay katecholowej, 2,3-dioksygenazy katecholowej oraz transferazy glutationowej (GST).

Pomiar aktywności oksygenaz prowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Wojcieszyńską i in. [112]. Do probówek zawierających 20 µl wyizolowanej frakcji białkowej dodawano 20 µl 0.1 µmol/ml roztworu pirokatecholu oraz 960 µl 10 mM buforu fosforanowego. Aktywność oksygenaz (OA) mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ=260 nm (powstawanie cis,cis-mukonianu w wyniku działania 1,2-dioksygenazy katecholowej) lub λ=375 nm (powstawanie semialdehydu 2-mukonowego w wyniku działania 2,3-dioksygenazy katecholowej) w czasie 3 min. Aktywność oksygenaz obliczono na podstawie wzoru (W7):

$$SAE = \frac{OA}{PC} \qquad \text{(W7)}$$

gdzie: **SEA** – specyficzna aktywność enzymatyczna [U na mg białka] 1,2-DO lub 2,3-DO; **OA** – aktywność badanej oksygenazy obliczona na podstawie absorbancji badanej próbki przy długości fali λ=260 nm (*cis*,*cis*-mukonian) lub λ=375 nm (semialdehyd 2-mukonowy), w oparciu o prawo Lamberta-Beera [mol/l]; **PC** – stężenie białka w próbce [mg/l]

Do pomiaru aktywności transferazy glutationowej wykorzystano zestaw dostępny komercyjnie (Glutatione S-Transferaze Assay Kit, Sigma-Aldrich) zgodnie z zaleceniami producenta. Absorbancję próbek mierzono przy długości fali λ=340 nm bezpośrednio po dodaniu odczynników, co 1 min, w czasie 6 min, a uzyskane wyniki wykorzystano do obliczenia zmiany absorbancji z czasie (ΔA_{340}/min), zgodnie ze wzorem (W8):

$$\Delta\frac{A_{340}}{min} = \frac{A_{340}FR - A_{340}IR}{T} \qquad \text{(W8)}$$

gdzie: $\Delta\frac{\boldsymbol{A_{340}}}{\boldsymbol{min}}$ – zmiana absorbancji badanej próbki w czasie [1/min]; $\boldsymbol{A_{340}FR}$ – absorbancja próbki zmierzona przy długości fali λ=340 nm po 6 min [-]; $\boldsymbol{A_{340}IR}$ – absorbancja próbki zmierzona przy długości fali λ=340 nm na początki pomiarów [-]; $\boldsymbol{T}$ – czas [min]

Aktywność GST w próbkach wyznaczono na podstawie wzoru (W9):

$$GST = \frac{\Delta\frac{A_{340}}{min}\times V\times D}{\varepsilon\times V_E} \qquad \text{(W9)}$$

gdzie: $\boldsymbol{GST}$ – specyficzna aktywność transferazy glutationowej [µmol/ml/min]; $\boldsymbol{V}$ – objętość badanej próbki [ml]; $\boldsymbol{D}$ – rozcieńczenie badanej próbki [-]; $\boldsymbol{\varepsilon}$ – współczynnik ekstynkcji 1-chloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) [1/mM/cm]; $\boldsymbol{V_E}$ – objętość wyizolowanej frakcji białkowej dodawanej do badanej próbki [ml]

5. Szczegółowa analiza zmian właściwości komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne

5.1. Profil błonowych kwasów tłuszczowych

Do przeprowadzenia analiz błonowych kwasów tłuszczowych mikroorganizmów wykorzystano metodę opisaną przez Sassera [113]. Do derywatyzacji badanych związków wykorzystano następujące roztwory (Tabela II. 5.):

Tabela II. 5. Skład roztworów wykorzystywanych do derywatyzacji bakteryjnych kwasów tłuszczowych

Symbol roztworu	Składnik 1	Masa/ Objętość	Składnik 2	Objętość
R1	NaOH	45 g	H_2O	150 ml
R2	CH_3OH	275 ml	HCl (6M)	325 ml
R3	C_6H_{14}	200 ml	$C_5H_{12}O$	200 ml
R4	NaOH	10,8 g	H_20	900 ml
R5	NaCl	180,27 g	H_2O	500 ml

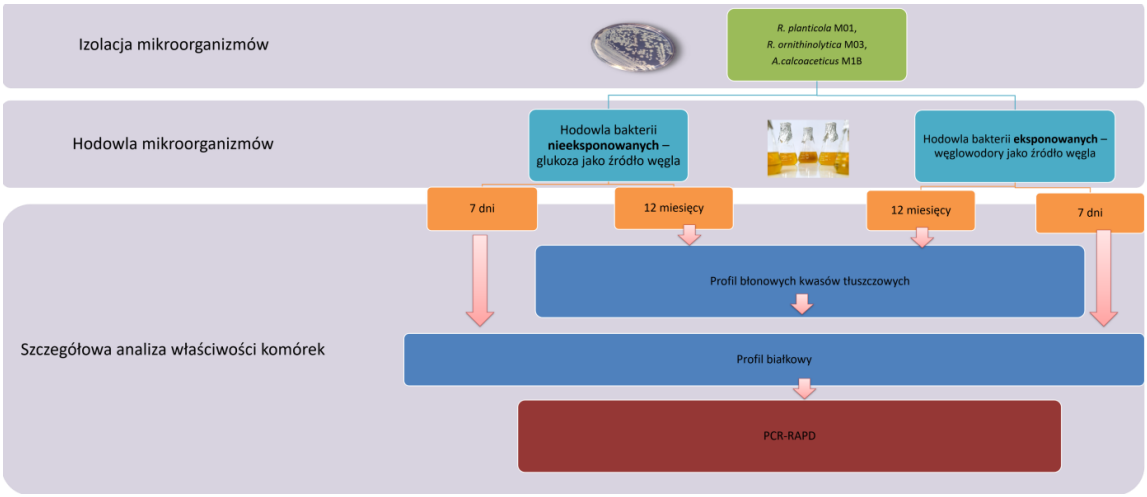
Biomasę z hodowli płynnych, przygotowaną zgodnie z wcześniejszym opisem (pkt. 4.1) przenoszono do probówek typu Pyrex® z wkładką PTFE (Scilabware, Wielka Brytania) i dodawano 1 ml roztworu R1 w celu uwolnienia kwasów tłuszczowych z komórek i przeprowadzenia ich w sole sodowe. Po wymieszaniu na worteksie przez ok. 20 s próbki ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 30 min. Następnie, do probówek dodawano po 2 ml roztworu R2, metylującego uwolnione kwasy tłuszczowe, mieszano na worteksie (20 s)

i inkubowano w łaźni wodnej o temperaturze 80°C przez 15 min. Po schłodzeniu przeprowadzano ekstrakcję uzyskanych estrów metylowych kwasów tłuszczowych poprzez dodanie 1 ml roztworu R3. Próbki delikatnie mieszano, a po rozdzieleniu się faz, fazę organiczną zbierano i dodawano do niej 3 ml roztworu R4, w celu usunięcia wolnych, niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych. Emulsyfikację próbek niwelowano poprzez dodanie 0,2 ml roztworu R5. Następnie do probówek chromatorgaficznych przenoszono po 0,5 ml próbek i poddawano je analizie chromatograficznej.

Próbki analizowano na chromatografie gazowym HP6890 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie kapilarnej Ultra-2 (25 m x 0,22 mm x 0,33 nm; 5% fenylo – 95% dimetylopolisiloksan), jako fazą stacjonarną oraz wodorem jako gazem nośnym (natężenie przepływu 1 ml/min). Identyfikację estrów metylowych kwasów tłuszczowych prowadzono z wykorzystaniem programu Sherlock 6.1 Microbial Identification System (MIDI Inc., Stany Zjednoczone) i biblioteki TSBA 6.0 [219]. Badania wykonano w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr Agnieszki Nowak.

5.2. Profile białkowe mikroorganizmów

Hodowle mikroorganizmów nieeksponowanych oraz eksponowanych na węglowodory aromatyczne prowadzono w butelkach o objętości 1000 ml, w celu uzyskania większej ilości biomasy. Do inokulacji hodowli wykorzystano inokulum mikroorganizmów z hodowli na bulionie wzbogaconym przygotowane odpowiednio z mikroorganizmów wzrastających na podłożu stałym z dodatkiem węglowodorów aromatycznych lub agarze wzbogaconym. Przed dodaniem do hodowli mikroorganizmy z inokulum zostały odwirowane (4500 *g*, 10 min, temp. 22°C) oraz przemyte 2-krotnie świeżym medium hodowlanym i zawieszone w odpowiedniej ilości sterylnego medium hodowlanego. Hodowla zawierała: 190 ml medium hodowlanego z dodatkiem roztworu mikroelementów (2 ml/l), 10 ml inokulum bakteryjnego oraz 3 ml mieszaniny odpowiednich węglowodorów lub oleju napędowego. Schemat przeprowadzonych doświadczeń został przedstawiony na Rysunku II. 4.



Rysunek II. 4. Schemat hodowli bakteryjnych i szczegółowych analiz modyfikacji komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne

W próbach zawierających mikroorganizmy nieeksponowane (próbach kontrolnych) jako źródło węgla w hodowli wykorzystywano 20% roztwór glukozy, dodając do hodowli 3 ml tego odczynnika. Hodowle inkubowano przez 7 dni w temperaturze 22°C, na wytrząsarce orbitalnej (120 rpm), następnie zwirowano (4500 *g*, 10 min, temp. 22°C) i przemywano świeżym medium hodowlanym. Uzyskaną biomasę zawieszono w 5 ml sterylnego medium hodowlanego, przeniesiono do szklanych probówek i przeprowadzano dezintegrację komórek poprzez sonikację (Bandelin SONOPLUS HD 2070), na lodzie, w 5 seriach 30-sekundowych z przerwą 30 między seriami. Frakcję białkową oddzielono przez wirowanie (10 000 *g*, 50 min, temp. 4°C). Supernatant zawierający frakcję białkową rozpipetowano do probówek typu Eppendorf i przechowywano do dalszych analiz zamrożony (-80°C).

Przed kolejnymi analizami próbki rozmrożono i zagęszczono w koncentratorze do objętości ok. 50 µl przez odparowanie rozpuszczalnika przy obniżonym ciśnieniu. Następnie przeprowadzono pomiar stężenia wyizolowanych białek za pomocą testu z kwasem bis-cynchoninowym (BCA). Do probówek typu Eppendorf o objętości 2 ml przenoszono po 2 µl wyizolowanych białek i zawieszano w 98 µl wody destylowanej. Następnie do każdej probówki dodawano po 2 ml Pierce™ BCA Protein Assay Kit, mieszano i inkubowano przez 30 min w termomikserze (700 rpm, 60°C). W kolejnym etapie na płytkę 96-dołkową przenoszono po 200 µl próbek po inkubacji i mierzono spektrofotormetrycznie ich absorbancję przy długości fali λ=562 nm. Stężenie wyizolowanych białek w próbkach obliczano na

podstawie krzywej wzorcowej. Do przygotowania krzywej wzorcowej wykorzystano roztwory białka BSA o stężeniach: 250, 125, 50, 25, 5 μg/ml.

Ostatnim etapem przygotowania frakcji białkowej do analiz proteomicznych było ich trawienie z wykorzystaniem trypsyny. Trawieniu poddawano próbki zawierające po 10 μg białka przenoszono do probówek o objętości 500 μl, a objętość frakcji białkowej dodawanej do probówek obliczono na podstawie wyników pomiarów z testu BCA. Następnie próbki uzupełniono wodą dejonizowaną do 10 μl, dodawano po 15 μl 50 mM wodorowęglanu amonu i 1,5 μl ditiotreitolu (DTT) i inkubowano 5 min w temp. 95°C w celu zredukowania mostków dwusiarczkowych występujących między grupami tiolowymi aminokwasów cysteiny. Po inkubacji przeprowadzano alkilację grup tiolowych, uniemożliwiającą odtworzenie mostków siarczkowych poprzez dodanie 3 μl jodoacetamidu (IAA) i inkubację 20 min w temperaturze pokojowej w ciemności. Trawienie białek zrealizowano poprzez dodanie do próbek po 2 μl trypsyny o stężeniu 0,1 μg/μl i inkubację w łaźni wodnej w temp. 37°C przez noc. Powstające w wyniku trawienia trypsyną fragmenty peptydowe o różnej długości analizowano z wykorzystaniem chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Łuczak, prof. IChB PAN w Europejskim Centrum Bioinformatyki i Genomiki w Poznaniu.

Do analiz proteomicznych wykorzystano chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Analizy dla nieznakowanych próbek (metodą *label-free*) prowadzono zgodnie z podejściem proteomicznym dla próbek zawierających 1,5 μg zawiesiny strawionych białek. Próbki nastrzykiwane były automatycznie na układ chromatograficzny Dionex UltiMate 3000 wyposażony w przedkolumnę (RP C18) oraz kolumnę analityczną (RP C18 Acclaim PepMap, o średnicy 75 μm x 25 cm, ziarnach 2 μm i średnicy porów 100 A). Analizę każdej próbki prowadzono w dwóch powtórzeniach. Z użyciem dwóch faz A: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie destylowanej; oraz B: 0,1% kwas mrówkowy w 90% acetonitrylu. Elucję prowadzono ze stałym przepływem 300 nl/min w gradiencie od 5% do 65% fazy B w czasie 230 min, a eluent poddawano analizie z wykorzystaniem wysokorozdzielczego spektrometru masowego Q-Exactive Orbitrap ze źródłem typu electrospray. Analizy przeprowadzano w rozdzielczości 70 000 w trybie MS oraz 17 500 w trybie MS/MS. Zakres skanów w trybie MS ustawiony był na peptydy o masach od 350 do 2 000 m/z.

Do identyfikacji oraz analiz statystycznych uzyskanych wyników wykorzystano oprogramowania MaxQuant (wersja 1.5.1.2) oraz Perseus (wersja 1.4.1.3) oraz bazy danych SwissProt/Uniprot. Analizy ilościowe wykonano na podstawie intensywności i powierzchni pików z widma MS (LFQ, label-free quantification), wyznaczając średnią intensywność i jej odchylenie standardowe dla wszystkich grup eksperymentalnych. Poprzez porównanie średnich intensywności LFQ wyznaczonych dla dwóch grup eksperymentalnych wyliczano krotność zmian (fold change), a białka były uznawane za różnicujące jeśli krotność zmian pomiędzy grupami wynosiła co najmniej +/-2 ze statystyczną istotnością $p < (0.01)$, oraz zostały zidentyfikowane z użyciem co najmniej 2 peptydów.

5.3. Analiza losowych amplifikacji polimorficznego DNA (PCR-RAPD)

Do izolacji materiału genetycznego z hodowli komórek przeprowadzonych zgodnie ze wcześniejszym opisem (pkt. 4.1) wykorzystano zestaw GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich). Izolację przeprowadzono zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta, a stężenie wyizolowanego DNA zmierzono spektrofotometrycznie. Następnie przeprowadzono reakcję losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA (PCR-RAPD) z wykorzystaniem 80 różnych starterów, sekwencje wybranych z nich zostały przedstawione w tabeli (Tabela II. 6).

Tabela II. 6. Sekwencje wybranych starterów wykorzystanych w reakcji losowej amplifikacji polimorficznych fragmentów DNA

Symbol startera	Sekwencja nukleotydowa
A2	5′ TGCCGAGCTG 3′
A3	5′ AGTCAGCCAC 3′
A4	5′ AATCGGGCTG 3′
A9	5′ GGGTAACGCC 3′

Mieszaninę reakcyjną przygotowano na płytkach 96 dołkowych, a w jej skład wchodziło: 1 μg wyizolowanego DNA; 0,2 mM dNTP; 2,5 μl buforu reakcyjnego; 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 μl startera; 1 U polimerazy Taq DNA oraz 18 μl wody dejonizowanej. Reakcję prowadzono w termocyklerze (Mastercycler ep Gradient5341, Eppendorf) zgodnie z programem (40 cykli): 30 s denaturacji (92°C), 30 s aniling 31°C; 1 min polimeryzacja (72°C). Zamplifikowane fragmenty rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym

z dodatkiem 500 ng/ml bromku etydyny i wizualizowano pod lampą UV (GelDoc-ItImaging System, UVP).

6. Analizy chromatograficzne

6.1. Hodowle do testów biodegradacji

Hodowle do testów biodegradacji odpowiednich węglowodorów, do analizy porównawczej zdolności degradacyjnych mikroorganizmów eksponowanych i nieeksponowanych na węglowodory, przygotowano w butelkach o pojemności 100 ml. Do każdej butelki wprowadzono 19 ml medium MSM, 1 ml odpowiedniego inokulum bakteryjnego (przygotowane z odpowiedniej linii komórek testowanych bakterii, OD_{600} = 1,0), 150 µl roztworu mikroelementów oraz 50 µl odpowiedniej mieszaniny węglowodorów, oleju napędowego lub 10% roztworu bursztynianu sodu. Kontrolę abiotyczną prowadzono w układach identycznych jak próby badawcze, jednak zamiast inokulum bakteryjnego dodawano 1 ml medium MSM. Szczelnie zamknięte butelki inkubowano na wytrząsarce (120 rpm) w temp. 22°C przez 7 lub 14 dni. Każdą hodowlę wykonano w trzech powtórzeniach dla każdego z analizowanych okresów inkubacji. Po upływie 7 lub 14 dni hodowle przenoszono do zamrażarki w celu zatrzymania procesów degradacyjnych i przechowania prób do dalszych analiz.

Hodowle biodegradacyjne do oceny możliwości wykorzystania uzyskanych szczepów w usuwaniu zanieczyszczeń węglowodorowych z próbek wodnych prowadzono analogiczne jak przedstawione powyżej próby, jednak zamiast medium w badaniach wykorzystano świeże próbki wody pobranej z zbiorników W1 i W2. Inokulum bakteryjne stanowił układ składający się z trzech testowanych bakterii (*R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03, *A. calcoaceticus* M1B, w stosunku 1:1:1, sumaryczne OD_{600} = 1,0) nieeksponowanych na weglowodory lub eksponowanych na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy przez 12 miesięcy w równych stosunkach, dla których sumaryczna gęstość optyczna wynosiła jeden. Jako próbę odniesienia wykorzystano hodowle składające się z świeżych próbek odpowiedniej wody (zawierających tylko mikroorganizmy autochtoniczne) oraz oleju napędowego, natomiast jako kontrole abiotyczne wykorzystano hodowle przygotowane w oparciu o odpowiednią wodę wyjałowioną w autoklawie.

Wszystkie próbki inkubowano 7 lub 14 dni, a następnie przechowywano zamrożone do dalszych analiz.

6.2. Przygotowanie prób chromatograficznych

W celu przeanalizowania pozostałości węglowodorów z badanych próbek, przeprowadzano ekstrakcję heksanem. Do zamrożonych próbek dodawano po 10 ml heksanu i 10 μl etylobenzenu jako standardu wewnętrznego, inkubowano w temperaturze pokojowej do rozmarznięcia pozostałości hodowli, dokładnie wytrząsano, a po rozdzieleniu się faz do fiolek chromatograficznych pobierano 1 ml próbki z każdej hodowli.

6.3. Analiza chromatograficzna

Analizę chromatorgraficzną prowadzono na chromatografie Pegasus 4D GCxGC-TOFMS (Leco), wyposażonym w autosampler (Gerstel). Rozdział prowadzono na kolumnie BPX-5 (28 m, 250 μm, 0.25 μm). Jako gaz nośny zastosowano hel w przepływie 1 ml/min, temperaturę dozownika ustawiono na 250°C. Nastrzykiwano 1 μl próbki. Przez pierwsze 2 min analizy na piecu utrzymywana była temperatura 40°C, następnie narost temperatury wynosił 15°C/min do osiągnięcia 300°C. Końcowa temperatura utrzymywana była przez 3 min. Chromatograf sprzężony był ze spektrometrem mas, który prowadził analizy eluentu z kolumny z wykorzystaniem źródła jonów pracującego w trybie jonów dodatnich. Temperatura źródła jonów wynosiła 250°C, a energia 70 eV. Analizy ilościowe prowadzone były dla jonów o masie 57 (węglowodory alifatyczne), 91 (węglowodory aromatyczne) lub dla całego widma (analizy degradacji ON). Do analizy danych wykorzystano program Chroma TOF-GC v4.51.6.0.

7. Analiza metagenomowa

Izolację materiału genetycznego z próbek prowadzono zgodnie z opisem w sekcji 5.3. Wyizolowane DNA przebadano pod kątem ilościowym i jakościowym z wykorzystaniem spektrofotometru. Próbki zabezpieczono parafilmem i przekazano do dalszych analiz do firmy Genomed. Zgodnie z dostarczonym przez firmę Genomed raportem sekwencjonowania genomowego, analiza metagenomiczna genu kodującego 16S rRNA została przeprowadzona na bazie hiperzmiennego regionu V3-V4 genu 16S rRNA.

Do amplifikacji wybranego regionu i przygotowania biblioteki zostały użyte specyficzne sekwencje primerów 341F oraz 785R. Reakcję PCR przeprowadzono z użyciem Q5 Hotstart High-Fidelity DNA Polymerase (NEBNext), w warunkach zgodnymi z zaleceniami producenta. Sekwencjonowanie odbyło się na sekwenatorze MiSeq, w technologii paired-end (PE), 2x250nt, z użyciem zestawu odczynników MiSeq Reagent Kit v2, zgodnie z zaleceniami producenta (Illumina). Automatyczna analiza danych została przeprowadzona na aparacie MiSeq z użyciem oprogramowania MiSeq Reporter (MSR) v2.6, protokół 16S Metagenomics. Analiza składała się z trzech etapów:

1) automatyczne demultipleksowanie próbek,
2) generowanie plików fastq, zawierających surowe odczyty,
3) klasyfikacja odczytów typu paired-end, w poszczególnych kategoriach taksonomicznych

Protokół 16S Metagenomics zapewnia klasyfikację odczytów do poziomu gatunku, opierając się na bazie danych sekwencji referencyjnych Greengenes v13_5, zmodyfikowanej przez Illuminę. Przygotowanie referencyjnej bazy danych sekwencji referencyjnych obejmowało:

- odfiltrowanie sekwencji o długości krótszej niż 1250 par zasad (pz);
- odfiltrowanie sekwencji zawierających więcej niż 50 zasad zdegenerowanych (M, R, W, S, Y, K, V, H, D, B, N);
- odfiltrowanie sekwencji niepełnie sklasyfikowanych (brak klasyfikacji do poziomu rodzaju lub gatunku).

8. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie pomiary były wykonywane w trzech powtórzeniach, dla których wyliczano średnią arytmetyczną oraz wariancję i odchylenie standardowe. W kolejnym etapie wykonano analizę wariancji i sprawdzono istotność różnic między seriami pomiarów za pomocą testu t-Studenta. W przypadkach, kiedy wariancje porównywanych serii pomiarowych nie były równe stosowano poprawkę Cochrana-Coxa [114]. Obliczenia oraz wykresy wykonano za pomocą oprogramowania SigmaPlot 11.0 (Systat Software).

WYNIKI BADAŃ, ICH ANALIZA I DYSKUSJA

1. Izolacja i selekcja mikroorganizmów

Pierwszym etapem prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badań było pozyskanie szczepów mikroorganizmów zdolnych do degradacji węglowodorów ropopochodnych. Pobrane z okolic stacji benzynowych, parku narodowego oraz brzegu jeziora próbki gleby oraz wody po przetransportowaniu do laboratorium zostały poddane czynnościom analitycznym.

Przeprowadzone hodowle selektywne pozwoliły na wyizolowanie dziewięciu szczepów bakteryjnych zdolnych do wzrostu na podłożu zawierającym olej napędowy. Na podstawie rezultatów badań biochemicznych, z wykorzystaniem bazy danych aparatu Vitek® 2, przeprowadzono wstępną identyfikację wyizolowanych mikroorganizmów na poziomie gatunkowym i przyporządkowano wyizolowane bakterie do następujących gatunków: *Pseudomonas fluorescens* M01-1; *Pseudomonas putida* M01-2; *Pseudomonas alcaligenes* M02-1; *Pseudomonas putida* M02-2; *Pseudomonas putida* M03-1; *Pseudomonas mendocina* M03-3; *Acinetobacter genomospecies* M1B; *Ochrobactrum anthropi* M1D; *Ochrobactrum anthropi* M2B. Wyniki przeprowadzonych prób biochemicznych zostały zebrane w Tabeli S1.

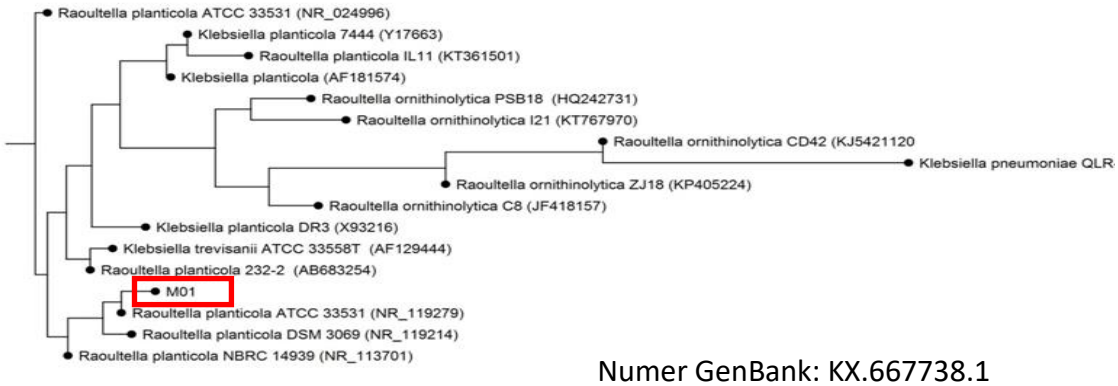
Spośród 47 przebadanych substratów reakcyjnych, wyizolowane bakterie nie były zdolne do wykorzystania 23 związków, a jedynym substratem metabolizowanym przez wszystkie badane szczepy była arylamidaza tyrozynowa (TyrA). Analizując różnice pomiędzy poszczególnymi szczepami, należy zauważyć, że w obrębie rodzaju *Pseudomonas* można wyróżnić trzy główne grupy biochemiczne. Do pierwszej grupy należy zaliczyć szczep *P. fluorescens* M01, charakteryzujący się jako jedyny z wizolowanych mikroorganizmów z rodzaju *Pseudomonas* do metabolizowania arylamidazy glicynowej (GlyA) oraz malonianów (MNT). Ponadto, w odróżnieniu od innych szczepów z rodzaju *Pseudomonas*, szczep *P. fluorescens* M01 nie posiadał zdolności do asymilacji kwasów jabłkowego i mlekowego (ILATa; IMLTa). Do drugiej wyróżniającej się grupy mikroorganizmów w obrębie rodzaju *Pseudomonas* należy zaliczyć szczepy *P. putida* M01-2, *P. putida* M02-2 oraz *P. putida* M03-1. Wyróżniają się one zdolnością do asymilacji histydyny. Dodatkowo, szczep *P. putida* M01-2 jako jedyny spośród analizowanych posiadał zdolność do metabolizowania sacharozy. Ostatnia, trzecia grupa szczepów w obrębie rodzaju *Pseudomonas* wyróżniała się

brakiem zdolności do alkalizacji mleczanu, odporności na pochodne pterydyny, nie posiadały też γ-glutamylo transferazy i nie rozkładały mannozy (dMNE) i kumaranów (CMT). Szczepy *P. alcaligenes* M02-1 i *P. mendocina* M03-3, które należy zaliczyć do tej grupy wykazywały również niewielkie różnice pomiędzy sobą, ponieważ bakterie z gatunku *P. alcaligenes* M02-1 nie rozkładały glukozy (dGLU) i cytrynianu sodu oraz nie alkalizowały bursztynianu (SUCT). Z kolei mikroorganizmy *P. mendocina* M03-3 rozkładały malonian (MNT) oraz wytwarzały arylamidazę β-alaniny pNA (BAIap). Pozostałe wyizolowane bakterie należą do rodzajów *Acinetobacter* oraz *Ochrobactrum*. Jedyny wyizolowany z rodzaju *Acinetobacter* szczep *Acinetobacter genomospecies* M1B charakteryzował się zdolnością do metabolizowania celobiozy (dCEL). Dwa szczepy zaklasyfikowane jako przedstawiciele gatunku *Ochrobactrum anthropi*, M1D i M2B, wyróżniały się spośród innych szczepów zdolnością do wytwarzania ureazy i arylamidazy pirolidonylowej, metabolizowania tagatozy i rozkładu odczynnika Ellman'a. Ponadto, szczep *O. anthropi* M1D jako jedyny spośród wyizolowanych szczepów był zdolny do rozkładu rybitolu (ADO).

W drugim etapie procesu selekcji mikroorganizmów wyizolowane początkowo mikroorganizmy przeniesiono na podłoże minimalne agar-agar zawierające olej napędowy jako jedyne źródło węgla. Po czterech tygodniach hodowli, trzy spośród wyizolowanych szczepów, zdolne do wzrostu na tym podłożu selektywnym, zostały poddane szczegółowym analizom genetycznym. Przeprowadzone sekwencjonowanie regionu 16S rRNA oraz analiza uzyskanych wyników w oparciu o program MegaBlast (NCBI), pozwoliły na zidentyfikowanie badanych szczepów mikroorganizmów na poziomie molekularnym. Dla każdego z badanych szczepów wykonano drzewo podobieństwa filogenetycznego, a sekwencje zidentyfikowanych mikroorganizmów zostały zgłoszone do bazy GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Rysunek III. 1).

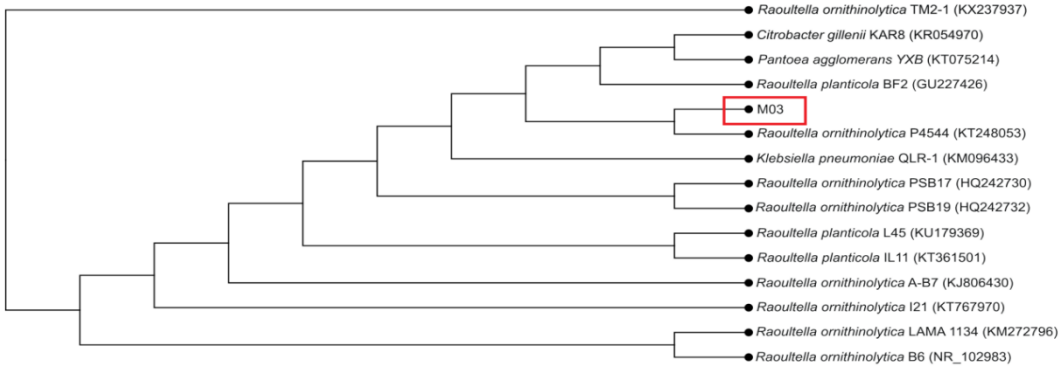
Zestawienie wyników identyfikacji genetycznej przedstawiono w Tabeli III. 1, z uwzględnieniem numerów w bazie GenBank przypisanych poszczególnym szczepom oraz źródła pochodzenia bakterii, a w dalszej części pracy do opisu mikroorganizmów używane będą nazwy zgodne z wynikami identyfikacji genetycznej bakterii.

A.



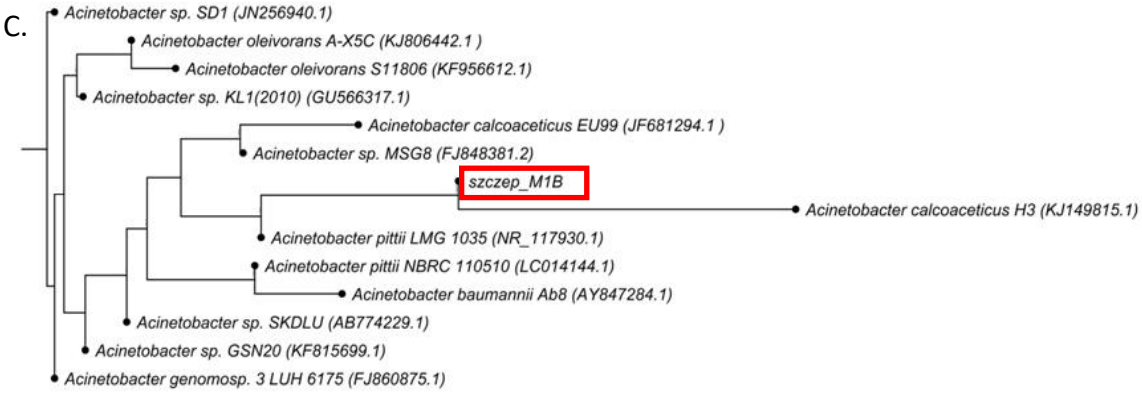
Numer GenBank: KX.667738.1

B.



Numer GenBank: KX.667739.1

C.



Numer GenBank: KU.563543.1

Rysunek III. 1. Drzewa pokrewieństwa filogenetycznego skonstruowane dla wyizolowanych mikroorganizmów na podstawie bazy NCBI: *R. planticola* M01 (A); *R. ornithinolytica* M03 (B); *A. calcoaceticus* M1B (C)

Tabela III. 1. Wyniki identyfikacji genetycznej, numery w bazie GenBank oraz pochodzenie próbek, z których wyizolowano mikroorganizmy

Oznaczenie (skrót)	Wynik identyfikacji genetycznej	Numer w bazie GenBank NCBI	Pochodzenie próbki
M01	*Raoultella planticola* M01	KX.667738.1	Gleba na terenie stacji benzynowej
M03	*Raoultella ornithinolytica* M03	KX.667739.1	Gleba na terenie stacji benzynowej
M1B	*Acinetobacter calcoaceticus* M1B	KU.563543.1	Gleba przy brzegu jeziora

Mikroorganizmy z rodzaju *Raoultella* zostały wydzielone na podstawie testów genetycznych z rodzaju *Klebsiella* w 2001 r., należą do rodziny *Enterobacteriaceae*, rzędu *Enterobacteriales*, klasy *Gammaproteobacteria*, typu *Proteobacteria*. Te gram-ujemne pałeczki są bakteriami tlenowymi, zdolnymi do wzrostu również w warunkach beztlenowych, fermentując glukozę do 2,3-butanediolu jako głównego produktu procesów anaerobowych. W testach biochemicznych charakteryzują się negatywnym wynikiem badania na obecność oksydazy i pozytywnym wynikiem dla katalazy. Wyróżniają się także zdolnością do wzrostu w temperaturze 10°C, a izolowane są z próbek środowiskowych pochodzących z wody, gleby i roślin [115].

Z kolei bakterie *Acinetobacter*, należą również do typu *Proteobacteria*, klasy *Gammaproteobacteria*, natomiast na poziomie rzędu klasyfikowane są jako *Pseudomonadales*, rodzina *Moraxellaceae* i zostały wydzielone jako osobny rodzaj w 1954 r. Bakterie te powszechnie zasiedlają wodę słodką, glebę i ścieki, stanowiąc znaczącą grupę organizmów tlenowych w tych środowiskach. Mikroorganizmy z rodzaju *Acinetobacter* są ściśle tlenowymi pałeczkami, uzyskującymi negatywny wynik w testach biochemicznych na obecność oksydazy i pozytywny w stosunku do katalazy. Są zdolne do wykorzystywania szerokiej gamy związków organicznych jako źródła węgla, również węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Ich cechą charakterystyczną jest brak zdolności do wbudowywania zawartej w podłożu tyminy lub tymidyny w łańcuch DNA oraz produkcja heteropolisacharydowego emulsanu podczas wzrostu na hydrofobowych substratach [116].

Wyizolowane szczepy różniły się od siebie w znaczącym stopniu w testach biochemicznych, a główne różnice biochemiczne pomiędzy trzema wybranymi do dalszych badań szczepami zostały zaprezentowane w Tabeli III. 2.

Tabela III. 2. Główne różnice biochemiczne pomiędzy szczepami *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 *i A. calcoaceticus* M1B

Odczynnik	*M01*	*M03*	*M1B*	Odczynnik	*M01*	*M03*	*M1B*
L-prolino-arylamidaza	+	+	-	cytrynian sodu	-	+	+
L-kwas mlekowy (alkalizacja)	+	-	+	L-histydyna (asymilacja)	-	-	+
arylamidaza glicynowa	+	-	-	D-cellobioza	-	-	+
2,4-diamino-6,7-diizopropylopteridyna (oporność)	+	-	+	γ-glutamilo transferaza	+	-	-
maltoza	-	+	-	kwas hydroksycynamonowy	+	-	+
kwas bursztynowy (alkalizacja)	+	+	-	kwas mlekowy (asymilacja)	-	+	-
L-kwas jałbkowy (asymilacja)	-	+	-	β-alanino-arylamidaza-pNA	+	+	-
mannoza	-	-	+				

Każdy z badanych szczepów posiadał unikalną zdolność do metabolizowania charakterystycznego substratu. W przypadku szczepu *R. planticola* M01 należy zwrócić uwagę na produkcję arylamidazy glicynowej, umożliwiającej hydrolizę wiązań w białkach oraz γ-glutamilo transferazy. Szczep *R. ornithinolytica* M03 charakteryzował się zdolnością do metabolizowania maltozy oraz asymilacji kwasu jabłkowego i mlekowego. Z kolei szczep *A. calcoaceticus* M1B wyróżniał się metabolizowaniem mannozy i D-cellobiozy oraz asymilacją L-histydyny.

Wyizolowane z próbek środowiskowych mikroorganizmy zdolne do wzrostu na podłożu zawierającym węglowodory jako jedyne źródło węgla zostały wybrane do dalszych analiz umożliwiających ocenę wpływu długotrwałej ekspozycji na węglowodory alifatyczne, aromatyczne lub olej napędowy na zdolności degradacyjne oraz wybrane właściwości bakterii.

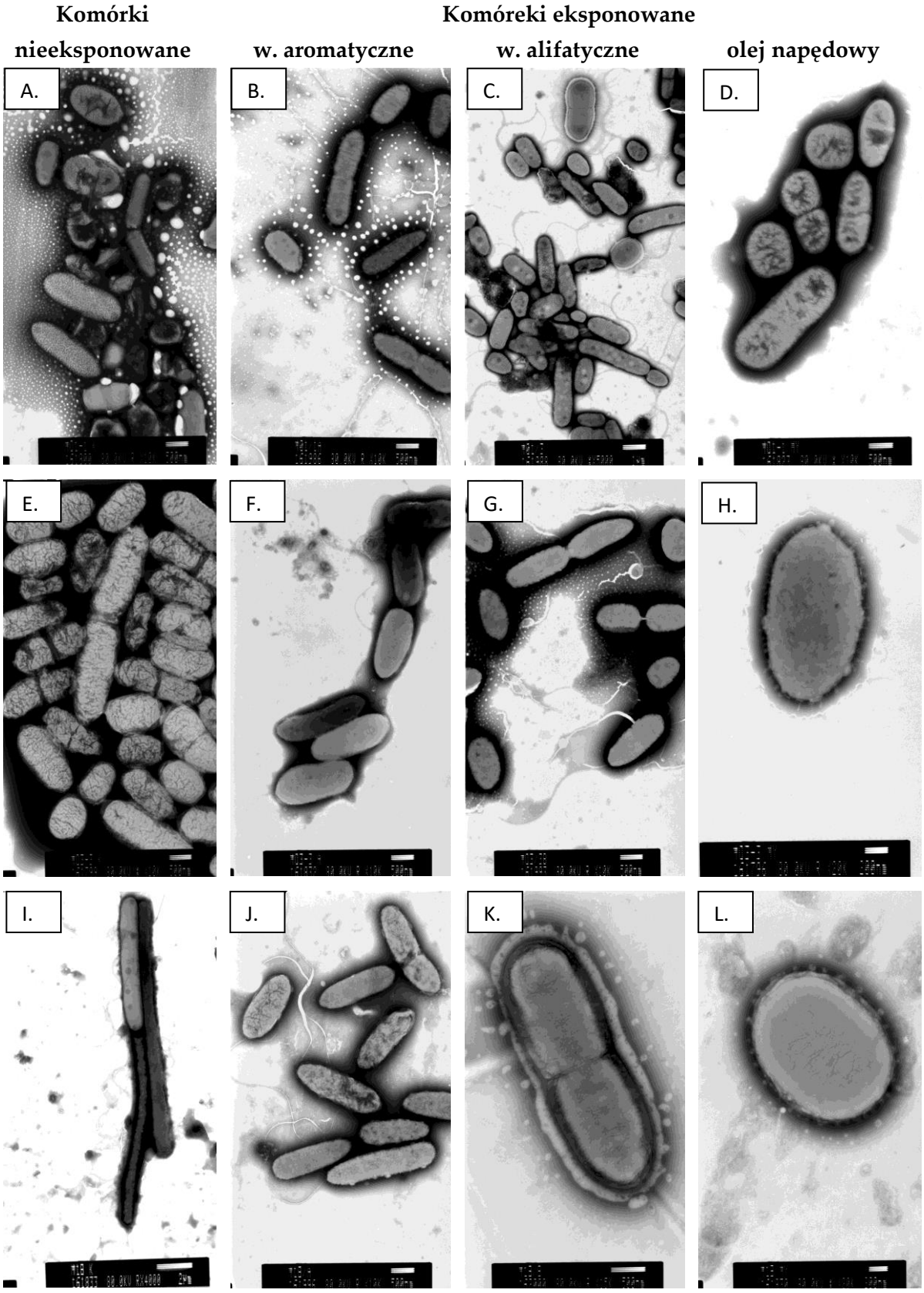
2. Ekspozycja na węglowodory i jej wpływ na właściwości komórek

Charakteryzujące się dużymi zdolnościami adaptacyjnymi bakterie zdolne są do przetrwania w niesprzyjających warunkach środowiska oraz modyfikacji właściwości powierzchniowych komórek w celu ewolucyjnego przystosowania do nowych warunków bytowania [117]. W niniejszej pracy podjęto próbę wywołania zmian adaptacyjnych w komórkach eksponowanych przez okres 12 miesięcy na węglowodory alifatyczne, aromatyczne lub olej napędowy. Komórki eksponowane na wybrane zanieczyszczenia węglowodorowe zostały następnie poddane wieloaspektowym analizom mającym na celu precyzyjne zdefiniowanie zmian zachodzących pod wpływem czynnika stresowego. W tym celu zbadano morfologię powierzchni komórek z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), hydrofobowość powierzchni oraz potencjał elektrokinetyczny bakterii, a także rozkład wielkości cząstek, przepuszczalność całkowitą oraz wewnętrzną błony komórkowej i aktywność wybranych enzymów. Uzyskane wyniki porównywano z wartościami otrzymanymi dla komórek nieeksponowanych na węglowodory, utrzymywanych na podłożu stałym (agar wzbogacony), dla których w hodowlach płynnych źródłem węgla była glukoza.

2.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Do porównania zmian morfologii komórek trzech badanych szczepów pod wpływem długotrwałej ekspozycji na węglowodory alifatyczne, aromatyczne lub olej napędowy wykorzystano mikroskop JEOL JEM-1200EX II przy napięciu przyspieszającym 80 kV. Analizy zmian morfologii komórek bakterii prowadzono przy powiększeniu 10 000 razy, a komórki kontrastowano z zastosowaniem 2% roztworu fosfowolframianu sodu. Zdjęcia przedstawiające mikroorganizmy nieeksponowane i eksponowane na zanieczyszczenia węglowodorowe zostały przedstawione na Rysunku III. 2.

Zaprezentowane zdjęcia pozwalają na obserwację znaczących różnic w wyglądzie wszystkich badanych komórek w wyniku przeprowadzonej ekspozycji.



Rysunek III. 2. Zdjęcia komórek nieeksponowanych i eksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe szczepów *R. planticola* M01 (A-D); *R. ornithinolytica* M03 (E-H) oraz *A. calcoaceticus* M1B (I-L)

W porównaniu do komórek z próby kontrolnej (nieeksponowanych), ekspozycja na zanieczyszczenia węglowodorowe we wszystkich badanych przypadkach skutkowała „opłaszczeniem" badanych mikroorganizmów, uniemożliwiającym dokładną analizę powierzchni po wybarwieniu oraz skróceniem i „napuchnięciem" komórek.

Najistotniejsze zmiany wystąpiły w wyniku ekspozycji na węglowodory aromatyczne, gdyż komórki eksponowane na związki monopierścieniowe są znacznie krótsze od odpowiadających im w próbie kontrolnej. Ponadto, intensywna produkcja substancji zewnątrzkomórkowych uniemożliwia prawidłowe przyłączanie barwnika kontrastującego, więc powierzchnia komórek sprawia wrażenie jednolitej. Bakterie w próbach odniesienia posiadają wyraźnie pofałdowaną, mozaikową strukturę powierzchni. Natomiast wydzielane przez mikroorganizmy w niekorzystnych warunkach środowiska substancje zewnątrzkomórkowe pełnią funkcję ochronną, tworząc trudno przepuszczalną barierę, a także wspomagają emulgację zanieczyszczeń i ich aktywny transport do wnętrza komórek. Przykład takich substancji wydzielanych intensywnie przez komórkę i „opłaszczających" ją widoczny jest w przypadku komórek szczepu *A. calcoaceticus* M1B eksponowanych na węglowodory alifatyczne (Rys. III. 2. K). Substancje wydzielane przez komórki wspomagają także procesy łączenia się i agregacji mikroorganizmów [103,104] (Rys. III. 2. F). Działanie emulgujące wydzielanych przez komórki związków można zaobserwować na Rysunku III. 2. B, G, H, J, K, L; gdzie widoczne są krople zdyspergowanych zanieczyszczeń, a także przyczepione do powierzchni komórek niewielkie, okrągłe struktury, które mogą być identyfikowane jako pęcherzyki błonowe (OMV). Również mikroorganizmy eksponowane na mieszaninę związków jaką jest olej napędowy (Rysunek III. 2. D, H, L) wykazywały podobną tendencję do zwiększenia objętości i zmniejszenia długości komórek, jednak występująca na ich powierzchni warstwa substancji zewnątrzkomórkowych nie była tak gruba i jednorodna jak w przypadku bakterii eksponowanych na węglowodory alifatyczne oraz aromatyczne, co umożliwiło częściowe wybarwienie powierzchni badanych komórek. Warte uwagi są również obecne w komórkach eksponowanych szczepu *R. planticola* M01 (Rysunek III. 2. C) jaśniejsze plamy, które można zidentyfikować jako ciałka inkluzyjne, służące do magazynowania trudno-degradowalnych i toksycznych substancji w postaci niezmienionej, wewnątrz cytoplazmy. Widoczne na niektórych zdjęciach podziały komórkowe, świadczą o zachowaniu

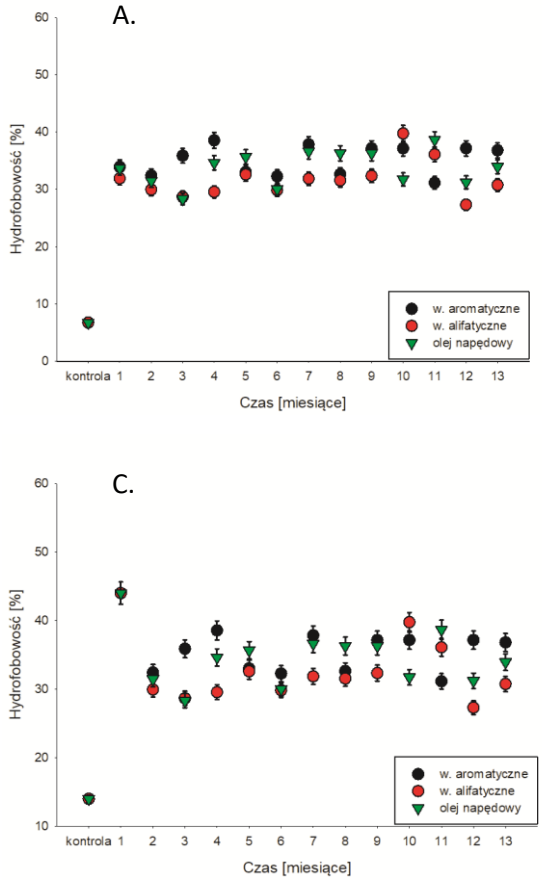
przez bakterie zdolności do namnażania się i braku przejścia w fazę VBNC występującą w wyniku działania ekstremalnych warunków stresowych.

2.2. Mikrobiologiczna adhezja do węglowodorów

Jednym z czynników mogących limitować przyłączenie się i efektywny transport zanieczyszczeń węglowodorowych do komórek jest ich hydrofobowy charakter. Mikroorganizmy wzrastające na podłożach zawierających hydrofobowe źródła węgla są zdolne do modyfikacji charakteru swojej powierzchni w kierunku cech umożliwiających lepszą adhezję i zwiększających biodostępność zanieczyszczeń. Pomiary zmian hydrofobowości powierzchni komórek badanych szczepów przeprowadzono z wykorzystaniem metody mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów (MATH), a wyniki przeprowadzonych analiz przedstawione są na Rysunku III. 3 i w Tabeli III. 3.

Początkowe wartości hydrofobowości powierzchni komórek wszystkich badanych szczepów mieściły się w zakresie przypisywanym charakterowi hydrofilowemu, i nie przekraczały 14%. W przypadku wszystkich badanych mikroorganizmów istotne zmiany wartości hydrofobowości powierzchni komórek następowały w ciągu pierwszego miesiąca i pomimo niewielkich fluktuacji utrzymywały się na porównywalnym poziomie przez cały okres prowadzenia ekspozycji (Rysunek III. 3). Analizując wartości w Tabeli III. 3 można stwierdzić znaczącą modyfikację charakteru powierzchni komórek w kierunku cech hydrofobowych w wyniku ich ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe po 12 miesiącach ekspozycji.

Największy wzrost mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów dla trzech testowanych szczepów miał miejsce w przypadku ekspozycji na węglowodory aromatyczne. Szczep *R. planticola* M01 charakteryzował się 6-krotnym wzrostem wartości CSH (z 6,72% do 36,8%) komórek poddanych ekspozycji tymi związkami. Natomiast szczepy *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B zwiększyły hydrofobowość powierzchni komórek odpowiednio do 44,95% oraz 37,15% po 12 miesiącach kontaktu z mieszanią związków aromatycznych. Dodatkowo, hydrofobowość powierzchni szczepu *A. calcoaceticus* M1B była najwyższa po pierwszym miesiącu ekspozycji na węglowodory aromatyczne, lecz w kolejnych miesiącach prowadzenia analiz nastąpiło obniżenie wartości CSH, które utrzymywało się na stałym poziomie (Rysunek III. 3 C).



Rysunek III. 3. Wartości mikrobiologicznej adhezji komórek do węglowodorów szczepów: *R. planticola* M01 (A); *R. ornithinolytica* M03 (B) oraz *A. calcoaceticus* M1B (C)

Tabela III. 3. Wartości hydrofobowości powierzchni komórek w próbie kontrolnej oraz po 12 miesiącach hodowli na podłożach selektywnych

Hydrofobowość powierzchni komórek [%]				
Szczep	**PK**	**AR**	**AL**	**ON**
R. planticola M01	6,72 ± 0,24	36,80 ± 1,33	30,74 ± 1,11	33,94 ± 1,22
R. ornithinolytica M03	11,71 ± 0,43	44,98 ± 1,66	43,94 ± 1,53	43,47 ± 1,61
A. calcoaceticus M1B	13,99 ± 0,51	37,15 ± 1,34	27,29 ± 0,98	31,21 ± 1,12

PK – próba kontrola; AR – węglowodory aromatyczne; AL – węglowodory alifatyczne; ON – olej napędowy

Komórki eksponowane na olej napędowy również zwiększyły hydrofobowość swojej powierzchni, osiągając po 12 miesiącach wartości 33,94%; 43,47% oraz 31,21%, odpowiedni dla szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B (Tabela III. 3).

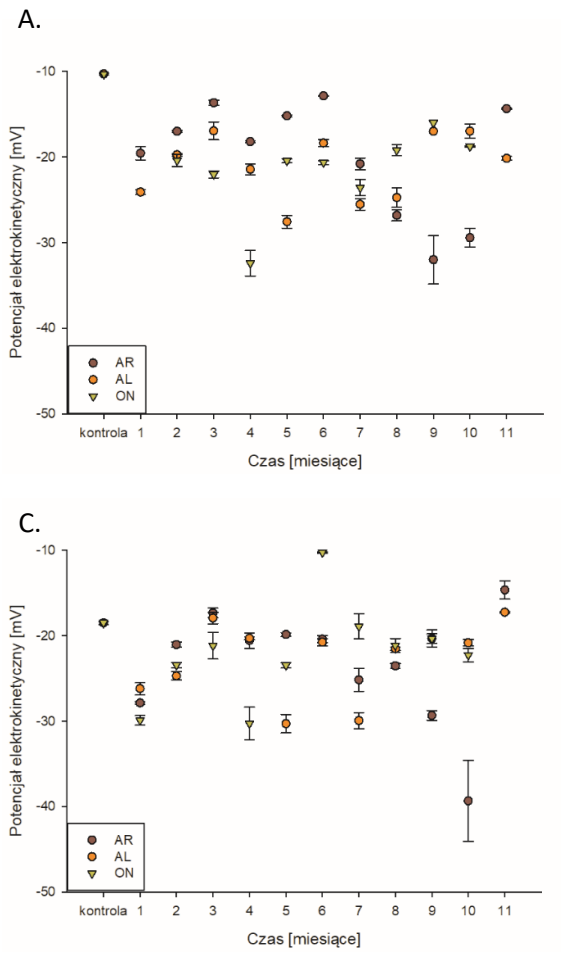
Uzyskane wartości hydrofobowości powierzchni komórek wzrastających na podłożu z dodatkiem mieszaniny węglowodorów alifatycznych były niższe niż w przypadku bakterii eksponowanych na węglowodory aromatyczne i olej napędowy. W tym przypadku tylko szczep *R. ornithinolytica* M03 charakteryzował się przekraczającą 40% mikrobiologiczną adhezją do węglowodorów po 12 miesiącach ekspozycji na związki alifatyczne (Tabela III. 3). Wartości CSH zmierzone dla pozostałych szczepów oscylowały w granicach 30%.

Należy podkreślić, że wartości CSH szczepu *R. ornithinolytica* M03 były bardzo podobne, niezależnie od źródła węgla wykorzystywanego podczas ekspozycji komórek. Z kolei powierzchnia komórek szczepu *A. calcoaceticus* M1B w najmniejszym stopniu uległa

modyfikacjom w kierunku cech hydrofobowych w stosunku do wartości zmierzonych dla komórek nieeksponowanych (PK).

2.3. Potencjał elektrokinetyczny komórek

Cechą mogącą również istotnie wpływać na zdolności komórek do przyswajania związków hydrofobowych jest ich potencjał elektrokinetyczny. Potencjał elektrokinetyczny (potencjał dzeta) charakteryzuje podwójną warstwę elektryczną znajdującą się na powierzchni komórek, która wpływa na mobilność elektroforetyczną bakterii oraz ich tendencję do agregacji. W niniejszej pracy pomiary potencjału dzeta komórek prowadzono w miesięcznych odstępach czasu przez cały okres ekspozycji komórek na węglowodory, a wyniki pomiarów przedstawiono na Rysunku III. 4 i w Tabeli III. 4.



Rysunek III. 4. Wartości potencjału elektrokinetycznego powierzchni komórek szczepów: *R. planticola* M01 (A); *R. ornithinolytica* M03 (B) oraz *A. calcoaceticus* M1B (C)

Tabela III. 4. Wartości potencjału elektrokinetycznego komórek w próbie kontrolnej oraz po 12 miesiącach hodowli na podłożach selektywnych

	Potencjał elektrokinetyczny [mV]			
Szczep	**PK**	**AR**	**AL**	**ON**
R. planticola M01	-10,30 ± 0,10	-14,35 ± 0,07	-20,15 ± 0,21	-18,77 ± 0,06
R. ornithinolytica M03	-12,27 ± 0,12	-27,50 ± 0,27	-21,93 ± 0,97	-17,47 ± 0,35
A. calcoaceticus M1B	-18,50 ± 0,17	-14,65 ± 1,06	-17,25 ± 0,07	-22,27 ± 0,78

PK – próba kontrola; AR – węglowodory aromatyczne; AL – węglowodory alifatyczne; ON – olej napędowy

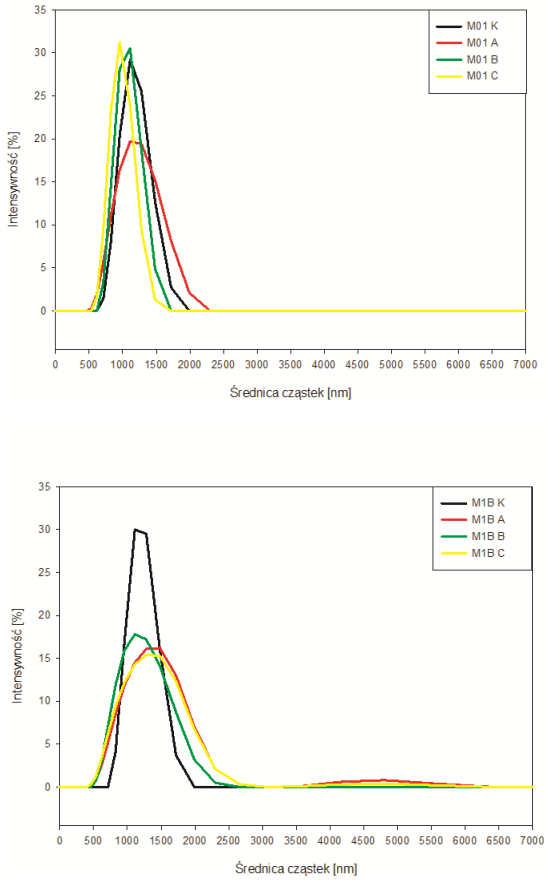
Ekspozycja komórek bakterii szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 oraz *A. calcoaceticus* M1B na węglowodory alifatyczne i aromatyczne spowodowała obniżenie wartości bezwzględnej potencjału elektrokinetycznego we wszystkich badanych przypadkach. Należy jednak zwrócić uwagę, że modyfikacje potencjału dzeta po 12-miesięcznej ekspozycji znacząco się różniły i zależały od zastosowanego w hodowli źródła węgla, jak i szczepu bakteryjnego. Szczepy bakterii *R. planticola* M01 i *A. calcoaceticus* M1B eksponowane na węglowodory aromatyczne charakteryzowały się najmniejszymi zmianami wartości potencjału elektrokinetycznego w stosunku do szczepów nieeksponowanych (odpowiednio zmiana: z -10,30 mV do -14,35 mV oraz z -18,50 mV do -14,65 mV). Odwrotna zależność występowała w przypadku szczepu *R. ornithinolytica* M03, gdzie komórki eksponowane na węglowodory aromatyczne posiadały najniższą wartość potencjału dzeta (-27,50 mV). Warto również zwrócić uwagę na znaczące fluktuacje wartości potencjału elektrokinetycznego mierzone w czasie, niezależne od rodzaju zastosowanego czynnika stresowego (Rysunek III. 4). Przedstawione wyniki wskazują również, że końcowa wartość potencjału dzeta (po 12 miesiacach ekspozycji) nie odbiegała znacząco od wartości wyjściowych, w przeciwieństwie do zmian hydrofobowości powierzchni komórek.

2.4. Rozkład wielkości cząstek

Narzędziem pozwalającym przeanalizować predyspozycje komórek do agragacji jest badanie rozkładu wielkości cząstek. W niniejszej pracy do analizy rozkładu wielkości cząstek po 12 miesiącach ekspozycji na wybrane węglowodory wykorzystano metodę dynamicznego rozpraszania światła (Rysunek III. 5.).

Przedstawione wyniki badań wskazują na występowanie niewielkich różnic w wielkości cząstek w układach zawierających komórki eksponowane na węglowodory oraz w próbie kontrolnej (komórki nieeksponowane). W przypadku szczepu *R. planticola* M01 największe różnice obliczonej średnicy cząstek odnotowano dla układu zawierającego komórki utrzymywane na podłożu zawierającym węglowodory aromatyczne. W układzie zawierającym komórki nie poddane ekspozycji na węglowodory dominowały cząstki o wielkości 0,96-1,28 μm (74% cząstek w próbce), natomiast w układzie z komórkami po 12-miesięcznej ekspozycji ich udział zmniejszył się do 57% (Rysunek III. 5). W tych układach ok. 10% stanowiły cząstki o średnicy powyżej 1.5 μm. Należy również zwrócić uwagę na duży wzrost polidyspersyjności zawiesiny komórek *R. planticola* M01 eksponowanych przez

12 miesięcy na węglowodory aromatyczne, wskazujący na większą zdolność układu do tworzenia agregatów (Tabela III. 5). Przesunięcia na wykresie w stronę układów większych i bardziej polidyspersyjnych obserwowane są również w próbkach zawierających komórki eksponowane na węglowodory alifatyczne, natomiast bakterie wzrastające w obecności oleju napędowego utrzymały wielkość ok. 1 µm. W próbach kontrolnych (nieeksponowanych) szczepów *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B sygnał o największej intensywności odpowiadał komórkom o wielkości ok. 1,2 µm, z kolei ekspozycja tych szczepów na wszystkie badane węglowodory przyczyniała się do znacznego zwiększenia polidyspersyjności układów oraz pojawienia się dodatkowej frakcji stosunkowo dużych cząstek w próbkach (o wielkości od ok. 3 do 6 µm) Rysunek III. 5B i C, Tabela III. 5).



Rysunek III. 5. Wykresy przedstawiające wyniki pomiarów średnicy cząstek w próbkach szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B w zależności od intensywności rozpraszanego światła

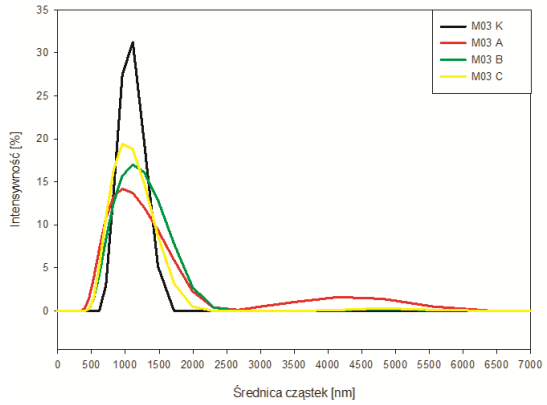


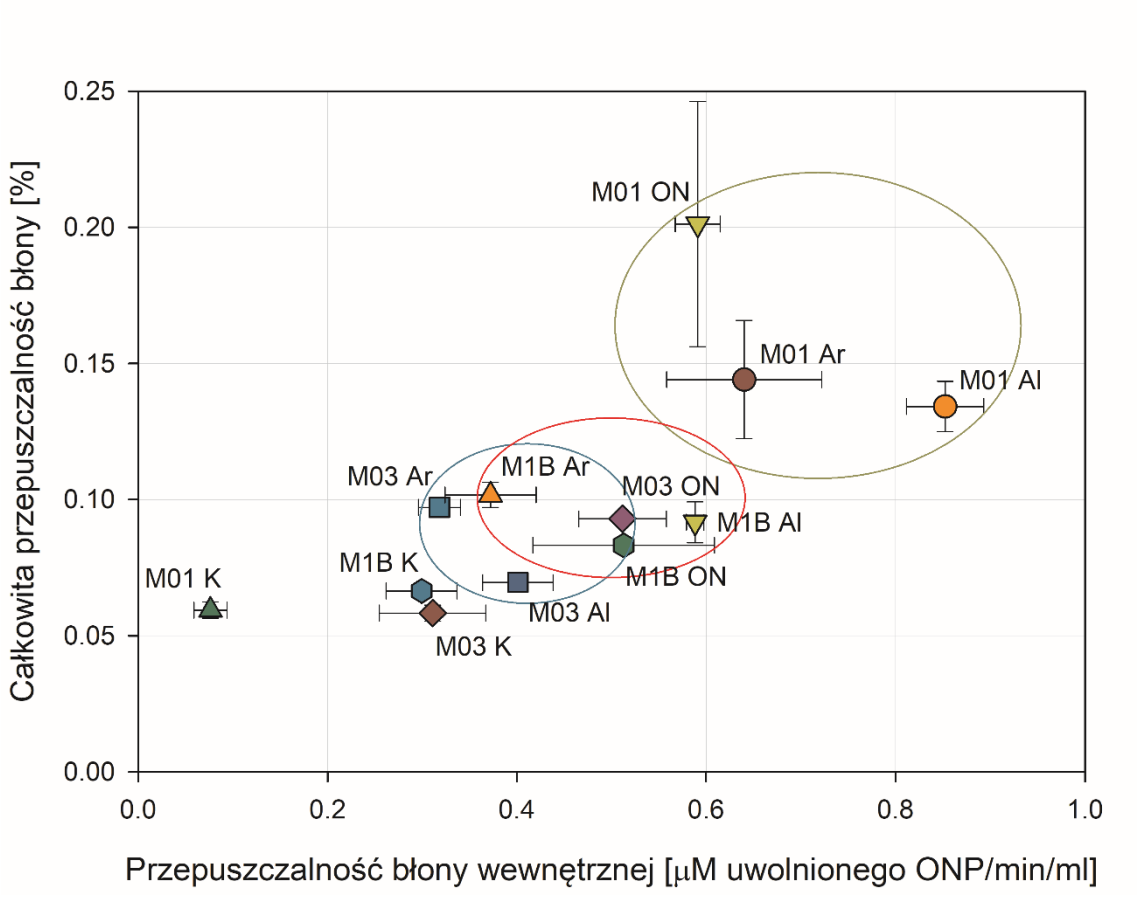
Tabela III. 5. Wartości indeksu polidyspersyjności badanych próbek (próba kontrolna oraz po 12-miesięcznej hodowli na podłożach selektywnych)

Indeks polidyspersyjności [-]				
Szczep	**PK**	**AR**	**AL**	**ON**
R. planticola M01	0,127	0,339	0,264	0,109
R. ornithinolytica M03	0,020	0,263	0,244	0,267
A. calcoaceticus M1B	0,162	0,381	0,196	0,229

PK – próba kontrola; AR – węglowodory aromatyczne; AL – węglowodory alifatyczne; ON – olej napędowy

2.5. Przepuszczalność błon komórkowych

Po przyłączeniu degradowanego związku do komórki niezbędny jest jego transport do jej wnętrza, gdzie będzie on podlegał dalszym przemianom metabolicznym. Ściana komórkowa, oddzielająca bakterie od środowiska zewnętrznego stanowi selektywną barierę dla związków wnikających do mikroorganizmów, a przepuszczalność błon komórkowych jest jednym z czynników mogących warunkować transport węglowodorowych substratów. W celu oceny różnic w przepuszczalności błon komórkowych pomiędzy bakteriami eksponowanymi i nieeksponowanymi na węglowodory przeprowadzono spektrofotometryczne testy przepuszczalności membrany komórkowej: całkowitej (z fioletem krystalicznym) oraz wewnętrznej (z ONPG). Wyniki badań przedstawiono na Rysunku III. 6).



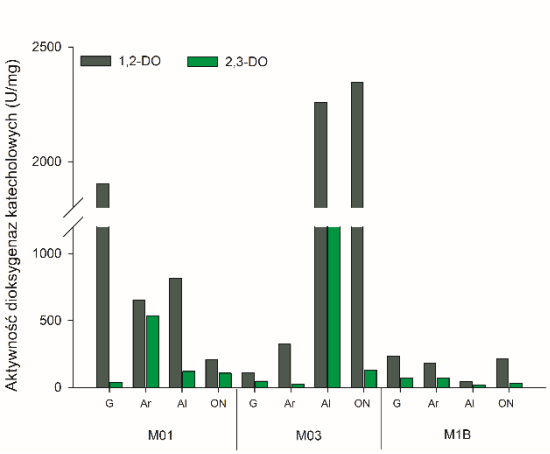
Rysunek III. 6. Wykres przedstawiający wyniki pomiarów wewnętrznej oraz całkowitej przepuszczalności błony komórkowej dla badanych szczepów *R. planticola* (M01), *R. ornithinolytica* (M03) oraz *A. calcoaceticus* (M1B), hodowanych na podłożach z dodatkiem: glukozy (K), węglowodorów aromatycznych (AR), węglowodorów alifatycznych (AL) lub oleju napędowego (ON)

Zebrane na wykresie dane pozwalają pogrupować uzyskane wyniki w zależności od podłoża na jakim wzrastały mikroorganizmy danego szczepu. We wszystkich badanych układach wzrost bakterii na podłożu zawierającym węglowodory aromatyczne, alifatyczne i olej napędowy powodował wzrost przepuszczalności błony komórkowej. Największe zmiany przepuszczalności obserwowano w przypadku szczepu *R. planticola* M01, gdzie wartość całkowitej przepuszczalności błony komórkowej zwiększyła się 4-krotnie (wzrost z 0,059% do 0,20%) lub nawet 8-krotnie (wzrost z 0,07 do 0,85 μM uwolnionego ONP/ml/min), porównując wyniki przepuszczalności wewnętrznej błony komórkowej dla bakterii wzrastających odpowiednio, na podłożu z olejem napędowym lub dodatkiem węglowodorów alifatycznych, w porównaniu do próby kontrolnej. Najniższą spośród badanych prób przepuszczalność błon komórkowych zaobserwowano dla szczepu *R. planticola* M01 nie poddanego ekspozycji na węglowodory, który był hodowany w układzie, gdzie źródłem węgla była glukoza (0,0763% TMP oraz 0,0594 μM uwolnionego ONP/min/ml). Szczepy *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B nie poddane ekspozycji na węglowodory posiadały wartości przepuszczalności błon komórkowych w zakresie 0,25-0,35 μM uwolnionego ONP/min/ml oraz 0,06-0,1%. Komórki tych szczpeów poddane ekspozycji na węglowodory charakteryzowały się maksymalnie dwukrotnym wzrostem wartości przepuszczalności błon komórkowych.

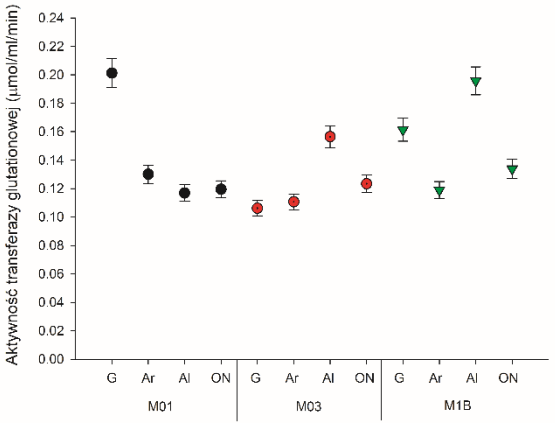
2.6. Aktywność wybranych białek enzymatycznych

Aparat enzymatyczny komórki jest odpowiedzialny za degradację dostępnych substratów w celu pozyskania energii. W niniejszej pracy porównano aktywność wybranych enzymów biorących udział w mikrobiologicznej degradacji węglowodorów (1,2-dioksygenazy oraz 2,3-dioksygenazy) a także transferazy glutationowej, odpowiedzialnej za ochronę komórki przed szkodliwym działaniem ksenobiotyków poprzez ich koniugację z grupami tiolowymi glutationu (Rysunki III. 7 i III. 8). Badania wykonano dla komórek nieeksponowanych lub eksponowanych przez 12 miesięcy na zanieczyszczenia węglowodorowe.

Wyniki pomiaru aktywności dioksygenaz, enzymów mogących brać udział w rozpadzie pierścienia aromatycznego podczas mikrobiologicznej degradacji węglowodorów przedstawiają znaczące różnice w aktywności badanych enzymów.



Rysunek III. 7. Aktywność dioksygenaz katecholowych w komórkach szczepów wzrastających na podłożu zawierającym glukozę (G) lub eksponowanych na węglowodory aromatyczne (AR), alifatyczne (AL) lub olej napędowy (ON): *R. plancticola* (M01), *R. ornithinolytica* (M03) oraz *A. calcoaceticus* (M1B)



Rysunek III. 8. Aktywność transferazy glutationowej (GST) w komórkach szczepów wzrastających na podłożu zawierającym glukozę (G) lub eksponowanych na węglowodory aromatyczne (AR), alifatyczne (AL) lub olej napędowy (ON): *R. plancticola* (M01), *R. ornithinolytica* (M03) oraz *A. calcoaceticus* (M1B)

Tabela III. 6. Wartości stężeń całkowitej wyizolowanej frakcji białkowej z komórek badanych szczepów hodowanych na różnych podłożach, szczepów *R. planticola* (M01), *R. ornithinolytica* (M03) oraz *A. calcoaceticus* (M1B)

Linia komórkowa	Źródło węgla w hodowli	Stężenie wyizolowanego białka [µg/ml]		
		Sczep bakterii		
		M01	M03	M1B
Komórki nieeksponowane	20% roztwór glukozy	0,42 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,63 ± 0,03
Komórki eksponowane	Mieszanina węglowodorów aromatycznych	0,13 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,53 ± 0,02
	Mieszanina węglowodorów alifatycznych	0,35 ± 0,01	0,04 ± 0,001	0,64 ± 0,03
	Olej napędowy	0,52 0,02	0,50 ± 0,02	0,52 ± 0,02

Modyfikacje aktywności katalitycznej tych enzymów obserwowane są wśród wszystkich badanych szczepów i różnią się w zależności od enzymu (1,2- lub 2,3-DO) i rodzaju podłoża, na którym hodowane były bakterie. Wszystkie badane mikroorganizmy wykazywały niższą aktywność 2,3-dioksygenzay katecholowej (2,3-DO) niż 1,2-dioksygenazy katecholowej (1,2-DO). Największą różnicę w aktywności tych enzymów odnotowano dla szczepu *R. ornithinolytica* M03 wzrastającego na podłożu z olejem napędowym. Należy zwrócić uwagę, że 2,3-dioksygenaza katecholowa wykazywała największą aktywność dla komórkek szczepu *R. planticola* M01 eksponowanego na

węglowodory aromatyczne oraz *R. ornithinolytica* M03 eksponowanego na węglowodory alifatyczne. W pozostałych przypadkach jej aktywność nie przekraczała 100 U/mg.

Znacznie większe fluktuacje aktywności obserwowano w przypadku 1,2-dioksygenazy katecholowej. Największą aktywność enzym ten wykazywał w komórkach szczepów *R. planticola* M01 oraz *A. calcoaceticus* M03, jednak zaobserwowano znaczące różnice aktywności w zależności od podłoża, na którym wzrastały bakterie. W przypadku szczepu *R. planticola* M01 największą aktywność katalityczną 1,2-DO zaobserwowano w komórkach wzrastających na podłożu z dodatkiem glukozy (komórki nieeksponowane) i wartość ta malała dla komórek eksponowanych na węglowodory. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku szczepu *R. ornithinolytica* M03, gdzie wartości aktywności katalitycznej były najmniejsze dla komórek nieeksponowanych, i wzrastały dla mikroorganizmów eksponowanych na węglowodory, osiągając najwyższą wartość dla komórek wzrastających na podłożu zawierającym olej napędowy (110,05 U/mg).

Analizując pomiary aktywności transferazy S-glutationowej (GST), można zaobserwować podobne zależności, jak w przypadku enzymów biorących udział w rozszczepieniu pierścienia aromatycznego. Najwyższe wartości aktywności tego enzymu odnotowano dla komórek szczepów *R. planticola* M01 (wzrastających na glukozie) i *R. ornithinolytica* M03 (eksponowanych na węglowodory alifatyczne), należy jednak również podkreślić wysoką aktywność 1,2-DO w komórkach szczepu *A. calcoaceticus* M1B wzrastających na glukozie lub eksponowanych na węglowodory alifatyczne.

Interesujące są również przedstawione w Tabeli III. 6. rezultaty pomiarów ilościowych całkowitego wyizolowanego z komórek białka. Obliczone na podstawie krzywej wzorcowej stężenia białka wyizolowanego z komórek różnią się znacząco w zależności od rodzaju podłoża. Najmniejszą ilość białka, świadczącą również o niewielkim przyroście biomasy, pozyskano ze szczepów *R. planticola* M01 (wzrastających na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych) oraz *R. ornithinolytica* M03 (wzrastających na podłożu z dodatkiem węglowodorów alifatycznych).

2.7. **Dyskusja wyników**

Mikroorganizmy narażone na działanie niekorzystnych warunków środowiskowych podejmują działania mające na celu modyfikację właściwości komórek pozwalających im na dostosowanie się i przetrwanie w nowym środowisku [28]. Przedstawione w niniejszej pracy

wyniki analiz właściwości powierzchniowych komórek eksponowanych na różne grupy zanieczyszczeń węglowodorowych udowadniają, że obserwowane modyfikacje są wynikiem wielopłaszczyznowych zmian, zachodzących z różną intensywnością w zależności od rodzaju działającego czynnika stresowego czy analizowanego szczepu.

Mikroskopia skaningowa jest jedną z technik pozwalających na obserwację zmian morfologii komórek. Wykorzystana w niniejszych badaniach technika transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) umożliwia obserwację morfologii komórek [118]. Zbliżone do obserwowanych dla szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B zmiany wielkości komórek, zostały również udokumentowane przez Michael i in. [81], którzy analizowali zmiany morfologii komórek szczepu *Pseudomonas stutzeri* ST-9 w hodowli z dodatkiem toluenu. Przeprowadzone przez nich pomiary na podstawie zdjęć SEM wykazały średni wzrost długości bakterii w hodowli z toluenem o 8,5% w porównaniu do próby kontrolnej hodowanej na glukozie, natomiast wyniki cytometrii przepływowej sugerują zwiększenie całkowitej wielkości komórek eksponowanych na węglowodory o 17%. Doniesienia literaturowe wskazują również na spadek współczynnika proporcji powierzchni komórek do ich wielkości oraz „wygładzenie" powierzchni komórek w wyniku ekspozycji na zanieczyszczenia organiczne, co pozwala na zredukowanie negatywnego wpływu węglowodorów poprzez zmniejszenie powierzchni kontaktu z nimi [80,119]. Podobne zmiany zostały również zaobserwowane w przypadku szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B, testowanych w niniejszej pracy, w wyniku ich ekspozycji na zanieczyszczenia organiczne. Na wygładzenie powierzchni badanych komórek obserwowane, m. in. w przypadku komórek szczepu *A. calcoaceticus* M1B eksponowanych na związki alifatyczne, może mieć wpływ również obecność w otoczeniu komórek zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS) oraz biosurfaktantów wydzielanych przez niektóre szczepy. Występowanie substancji zewnątrzkomórkowych zwiększa odporność bakterii na szkodliwe warunki środowiska, a ilość oraz skład wydzielanych EPS jest zależna m. in. od rodzaju mikroorganizmów, warunków hodowli oraz dostępnego dla mikroorganizmów źródła węgla [120,121]. Widoczne na powierzchni komórek eksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe pęcherzyki błonowe (OMV) to struktury zewnątrzkomórkowe wydzielane przez bakterie gram-ujemne o szerokim spektrum zastosowania dla komórek. Mogą one pełnić funkcję transportową, komunikacyjną, czy

obronną [118]. W komórkach eksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe zaobserwowano wydzielanie pęcherzyków błonowych zawierających związki toksyczne dostające się do komórek ze środowiska [91]. Kobayashi i in. [74] odnotowali eliminację cząsteczek toluenu przyłączających się do błony komórek szczepu *P. putida* IH-2000 poprzez wytwarzanie OMV o średnicy 80-100 nm i zawartości toluenu od 0,625 mol/mol lipidów do 0,160 mol/mol lipidów w ciągu 2 godzin od momentu dodania rozpuszczalnika organicznego do hodowli. Jednocześnie ilość cząstek toluenu przyłączonych do powierzchni komórek spadła z 0,077 mol/mol lipidów do 0,026 mol/mol lipidów w ciągu 3 h od dodania rozpuszczalnika i utrzymywała się na stałym poziomie przez resztę czasu trwania eksperymentu. Jak sugerują McBroom i Kuehn [91], produkcja OMV jest częścią odpowiedzi komórkowej na działanie czynników stresowych i zależy od natężenia ich działania oraz stopnia akumulacji nieprawidłowo sfałdowanych białek odpowiedzi komórkowej. Ponadto, obecne np. w komórkach szczepu *R. planticola* M01 ciałka inkluzyjne widoczne na zdjęciach TEM jako obszary o zmniejszonej gęstości elektronowej odpowiadają za magazynowanie szkodliwych substancji wewnątrz komórki i były obserwowane również w przypadku innych szczepów eksponowanych na węglowodory alifatyczne: Hua i Wang [76] zaobserwowali akumulację oktadeknolu w ciałkach inkluzyjnych *Pseudomonas* sp. DG17 eksponowanych na ten związek, Meng i in. [75] w komórkach *Pseudomonas synxantha* LSH-7' hodowanych w obecności heksadekanu, a Kim i in. [77] w bakteriach *Rhodococcus erythropolis* S+14He eksponowanych na heksadekan, oktadekan i pristan. Zmiany morfologii komórek obserwowane m. in. z wykorzystaniem technik mikroskopowych występują w komórkach charakteryzujących się zwiększoną odpornością na szkodliwą działalnością związków organicznych i związane są bezpośrednio ze zwiększoną przeżywalnością komórek, u których występują [119].

Przeprowadzone analizy hydrofobowości powierzchni komórek, z wykorzystaniem metody mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów pozwalają na szybką ocenę zmian charakteru powierzchni komórek mikroorganizmów. Hydrofobowość powierzchni (CSH) jest jednym z głównych czynników warunkujących adhezję węglowodorów do komórek oraz pozwalających na deemulsyfikację zanieczyszczeń [122]. Parametr ten jest związany silnie z budową i integralnością błony komórkowej, a zmienne takie jak aktywność mikrobiologiczna bakterii, warunki wzrostu, pH, temperatura, wydzielanie substancji

zewnątrzkomórkowych, czy czas mogą na niego silnie oddziaływać [95,122]. Zaprezentowane przez Prabhu i Phale [82] wyniki pomiarów hydrofobowości powierzchni komórek w czasie 12-godzinnych pomiarów wskazują również na znaczące różnice w wartości mierzonego CSH w zależności od fazy wzrostu komórek. Wiele doniesień literaturowych wskazuje na wzrost hydrofobowości powierzchni komórek mikroorganizmów w wyniku kontaktu z węglowodorami, pozwalający na bezpośrednie interakcje między hydrofobową powierzchnią komórki i zanieczyszczeniami [37,88,123]. Jimoh i Lin [88] wykazali związek wartości CSH z rodzajem węglowodorów, na których wzrastały komórki. Badany przez nich szczep *Paenibacillus* sp. D9 charakteryzował się wzrostem hydrofobowości powierzchni wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowodorów alifatycznych w medium hodowlanym (z 49,1% dla heksanu, przez 63,2% dla dodekanu do 65,5% dla heksadekanu). Posiadał on także wysoką, ok 70% hydrofobowość w hodowlach z dodatkiem cyklicznego nienasyconego węglowodoru alifatycznego (nonenu) oraz mieszanin węglowodorów takich jak olej silnikowy, olej napędowy. Autorzy zwrócili również uwagę na stosunkowo niewielki wzrost CSH komórek w obecności węglowodorów aromatycznych takich jak toluen czy fenol (odpowiednio 42,2% i 41,6%). Z kolei Obuekwe i in. [37] badali związek hydrofobowości powierzchni komórek z ich zdolnościami do biodegradacji węglowodorów. Stwierdzili oni najwyższy potencjał degradacyjny u mikroorganizmów o silnie hydrofobowej powierzchni (ponad 80% zdegradowanej ropy naftowej przez szczepy *Bacillus licheniformis* i *Bacillus cereus* o CSH powyżej 60%), jednak niewiele mniejszymi zdolnościami degradacyjnymi charakteryzowały się szczepy o hydrofilowej lub umiarkowanie hydrofobowej powierzchni, takie jak *Pseudomonas amylolitycus* (biodegradacja 67%, CSH 6%), *Pseudomonas aeruginosa* (biodegradacja 70%, CSH 39%) czy *Bacillus simplex* (biodegradacja 66%, CSH 20%). Również Mawad i in. [96] odnotowali wzrost hydrofobowości powierzchni komórek do umiarkowanych wartości podczas degradacji pirenu przez szczep *Achromobacter denitrificans* ASU-035. Jak wskazuje Bouchez Naitali [124], komórki charakteryzujące się umiarkowaną wartością CSH preferują mechanizm bezpośredniego lub wspomaganego przez biosurfaktanty poboru związków hydrofobowych z podłoża. Należy również zwrócić uwagę na znaczną dywersyfikację wartości hydrofobowości powierzchni komórek odnotowywaną pomiędzy różnymi gatunkami [125,126], jak i w obrębie izolatów jednego szczepu pobieranych z kolejnych pasaży [69]. Ponadto, badania nad związkiem hydrofobowości

powierzchni komórek i ich właściwości emulsyfikacyjnych prowadzone przez Fernandes i in. [127] dowodzą, że korelacja pomiędzy hydrofobowością komórek a ich zdolnościami do emulsyfikacji zanieczyszczeń zależy od rodzaju wykorzystywanego szczepu oraz jego wcześniejszych warunków hodowli. Modyfikacje hydrofobowości powierzchni komórek bakteryjnych mogą być również związane z wydzielaniem przez komórki pęcherzyków błonowych (OMV), jak dowodzili Baumgarten i in. [36] w badaniach poświęconych reakcji bakterii szczepu *Pseudomonas putida* DOT-T1E na obecność 1,25 mM 1-oktanolu; 2 M NaCl; 10 mM EDTA, szok cieplny, czy produkcją przez bakterie biosurfaktantów lub EPS. Wyniki badań CSH prowadzone dla produkującego biosurfaktanty szczepu *Pseudomonas* sp KZ1, wskazują na spadek hydrofobowości powierzchni komórek hodowanych w obecności oleju napędowego, w porównaniu do próby kontrolnej prowadzonej na glukozie. Należy jednak podkreślić, że komórki te „rekompensowały" sobie niewielką hydrofobowość powierzchni niską wartością potencjału elektrokinetycznego [128]. Dodatkowo, van der Mei i in. [129] podkreślają, że pomiary hydrofobowości powierzchni komórek prowadzone z wykorzystaniem metody mikrobiologicznej adhezji do węglowodorów pozwalają określić nie tylko oddziaływania hydrofobowe ale również elektrostatyczne pomiędzy składnikami próbki, sugerując, że podział komórek na hydrofobowe i hydrofilowe na podstawie testu MATH wskazuje raczej na niewielkie powinowactwo „hydrofobowych" bakterii do wody, niż ich podwyższone powinowactwo do heksadekanu.

W związku z silnym powiązaniem oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych występujących na powierzchni mikroorganizmów, uzupełnieniem prowadzonych analiz hydrofobowości powierzchni komórek były badania potencjału elektrokinetycznego bakterii eksponowanych i nieeksponowanych na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy. Występujący na powierzchni komórek negatywny ładunek elektrostatyczny jest wynikiem ekspozycji na powierzchni komórek grup fosforylowych i karboksylanowych, a w przypadku bakterii gram-ujemnych najistotniejszymi składnikami błony wpływającymi na wartość tego ładunku są właśnie grupy fosforylowe i karboksylanowe związane z lipopolisacharydami błonowymi [130]. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pomiarów potencjału dzeta komórek wskazują na wzrost potencjału elektrokinetycznego badanych bakterii w wyniku ekspozycji na węglowodory. Oberoi i Philip [84] zaobserwowali korelację pomiędzy zmianami hydrofobowości powierzchni komórek, a ich potencjałem

elektrokinetycznym. Badany przez nich szczep *Chryseobactrium* sp. charakteryzował najniższą wartoscią bezwzględną ładunku powierzchniowego na podłożach zawierających chinolan i pirydynę w stężeniu, odpowiednio 500 i 1000 mg/l. Jednocześnie, towarzyszył im najwyższy wzrost wartości CSH. Jednak Abbasnehzad i in. [131] analizując wpływ kationowego surfaktantu (chlorku cetylopirydyny), poli-L-lizyny, glukoniany chlorheksydyny, 1-dodekanolu i farnezolu na adhezję bakterii szczepu *P. fluorescens* LP6a do fazy organicznej stwierdzili występowanie dwóch różnych mechanizmów adhezji. Podczas gdy alkohole powodowały silny wzrost hydrofobowości komórek, zwiększając ich adhezję do fazy organicznej; dodatek kationowych surfaktantów wywoływał taki sam efekt poprzez zmniejszenie potencjału dzeta komórek. Przedstawione w Tabeli III. 5 (Rozdział 2.3 Potencjał elektrokinetyczny) różnice w uzyskiwanych wartościach potencjału elektrokinetycznego dla mikroorganizmów hodowanych na podłożach z dodatkiem różnych węglowodorów korelują z rezultatami badań prowadzonych przez Chakraborty i in. [38] dla szczepów *Burkholderia cepacia*-ES1, *Burkholderia multivorans*-HN1 oraz *Burkholderia multivorans*-NG1. Autorzy zaobserwowali intensywne fluktuacje tego parametru w obrębie badanych próbek w zależności od źródła węgla dostępnego w podłożu, jak i siły jonowej buforu, w którym zawieszone były komórki podczas pomiarów oraz pH zawiesiny. W przeciwieństwie do Oberoi i in. [84], zaobserwowali oni również odwrotną korelację pomiędzy ładunkiem powierzchniowym komórek a zdolnością do adhezji do heksadekanu [38]. Można zatem wnioskować, że modyfikacje hydrofobowości powierzchni komórek i ich potencjału elektrokinetycznego są zależne od wielu czynników występujących w badanym środowisku i nie można jednoznacznie skorelować uzyskiwanych wartości z przewidywanymi właściwościami mikroorganizmów. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi podwyższona elektroujemność może predysponować komórki do przyłączania związków hydrofobowych [84], jednak zbyt duży negatywny ładunek występujący pomiędzy komórką i substratem może uniemożliwiać takie połączenie [38].

Zmiany hydrofobowości powierzchni komórek oraz ich potencjału dzeta są również związane z wydzielaniem przez nie substancji zewnątrzkomórkowych, takich jak EPS. Związki to wpływają na zdolność komórek do bioflokulacji zanieczyszczeń. Wzrost hydrofobowości powierzchni komórek oraz ich potencjału elektrokinetycznego wpływa pozytywnie na zdolność komórek do flokulacji [132]. Zjawisko flokulacji bakterii

w obecności hydrofobowych zanieczyszczeń może mieć pozytywny wpływ na zdolności biodegradacyjne mikroorganizmów, jednak jest ono zależne od wielu czynników, takich jak gradient stężenia substratu, występowanie stresu fizlojogicznego, czy oddziaływania zachodzące między komórkami [133–135]. Sayavedrs-Soto i in. [103] potwierdzili flokulację bakterii *Rhodococcus* NTU-1 podczas hodowli z dodatkiem heksadekanu i pristanu. Stwierdzili oni, że pozytywne oddziaływanie flokulacji na zdolności degradacyjne mikroorganizmów może być związane z promowaniem bezpośredniego oddziaływania bakterii z zanieczyszczeniami oraz unieruchamianiem zanieczyszczeń poprzez ich flokulację. Obecność czynników wspomagających flokulację komórek podczas hodowli z dodatkiem związków hydrofobowych potwierdzili również Chang i in. [102] (komórki *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 na podłożu z dodatkiem długołańcuchowych alkanów), Pathak i in. [104] (komórki *Pseudomonas aeruginosa* IASST201 na podłożu z dodatkiem ropy naftowej). Kłodzińska i in. [136] odnotowali również, że wraz ze spadkiem potencjału elektrokinetycznego komórek zwiększa się liczba agregatów bakteryjnych w próbkach, co powoduje podwyższenie indeksu polidyspersyjności (PdI), obserwowane również w przypadku badanych mikroorganizmów eksponowanych na węglowodory aromatyczne, alifatyczne i olej napędowy. Jak wskazują dane literaturowe, zwiększenie średnicy cząstek oraz indeksu ich polidyspersyjności w wyniku kontaktu z zanieczyszczeniami hydrofobowymi może być wynikiem flokulacji komórek, z którą korelują pozytywnie uzyskane wyniki pomiarów CSH oraz potencjału dzeta [102–104].

Wyniki pomiarów zmian przepuszczalności całkowitej oraz wewnętrznej błony komórkowej sugerują wzrost przepuszczalności membrany w wyniku ekspozycji komórek na badane węglowodory. Niewielka rozpuszczalność i dyfuzja związków hydrofobowych w wodzie oraz ograniczenia w ich transporcie przez błonę komórkową wskazują na rozluźnianie struktury i wzrost przepuszczalności zewnętrznych błon komórek w wyniku kontaktu z zanieczyszczeniami węglowodorowymi. Modyfikacje struktury błony będące przyczyną obserwowanych zmian przepuszczalności obejmują zmiany: składu lipidowego wewnętrznej błony komórkowej, stosunku ilości lipidów i białek błonowych, wzrost aktywności enzymów błonowych biorących udział w początkowych etapach degradacji węglowodorów oraz przekazywania energii w komórce, a także modyfikacje składu lipopolisacharydów błonowych (LPS) [40,137]. Zmiany te znajdują potwierdzenie

w doniesieniach literaturowych: Michael i in. [81] zaobserwowali wzrost przepuszczalności błony komórek *Pseudomonas stutzeri* ST-9 w hodowli z toluenem, Nunes i in. [46] odnotowali wzrost płynności membrany komórek narażonych na kontakt z pochodnymi fenolu. Hearn i in. [41] zaobserwowali wspomaganie transportu zanieczyszczeń aromatycznych przez błonę przez białka TodX i TbuX (należące do rodziny FadL) w komórkach *Pseudomonas putida* i *Ralstonia pickettii*, a udział białek z tej rodziny w aktywnym transporcie zanieczyszczeń odnotowali także inni badacze [31,137]. Z kolei Hong i in. [138] oraz Neher i Lueking [139] zaobserwowali udział białek z rodziny OmpW w transporcie cząstek hydrofobowych przez błonę komórek *E. coli* i *Pseudomonas fluorescens*. Małocząsteczkowe węglowodory mogą również przenikać do wnętrza komórek na zasadzie transportu pasywnego, jak wykazali Miyata i in. [42]. Warte podkreślenia jest, że przepuszczalność wewnętrznej błony komórkowej dla tych związków hydrofobowych jest skorelowana z ich współczynnikiem podziału między olej i wodę (K_{OW}) [140], jednak ilość węglowodorów aromatycznych która może być przetransportowana do komórki zależy również od ich toksyczności, która może powodować nieodwracalne uszkodzenia membrany i śmierć komórki [40].

Ostatnim z analizowanych parametrów była aktywność wybranych enzymów biorących udział w metabolizowaniu i neutralizowaniu szkodliwych związków. Badane dioksygenazy katecholowe mogą brać udział w początkowych etapach degradacji związków aromatycznych, katalizując rozszczepienie pierścienia aromatycznego [112], jednak nie są one uniwersalnymi enzymami, których podwyższoną aktywność wykrywa się podczas degradacji ksenobiotyków [8]. W literaturze opisywane są różne enzymy biorące udział w degradacji węglowodorów przez mikroorganizmy. Badane w niniejszej pracy 1,2- i 2,3-dioksygenazy katecholowe należą do dioksygenaz ekstradiolowych typu I, jednak rozkład pierścienia aromatycznego może zachodzić również z udziałem enzymów należących do dioksygenaz ekstradiolowych typu II oraz typu III [67,141]. Wyniki badań prowadzonych przez Wojcieszyńską i in. [112] dla szczepu *Stenotrophomonas maltophilia* wskazują na zróżnicowaną odpowiedź enzymatyczną komórki w zależności od dostępnych substratów. W badanych układach kometabolicznych najwyższa aktywność 3,4-dioksygenazy protokatecholowej została odnotowana w hodowlach z nitrofenolem i 3,4-dihydroksy kwasem benzoesowym, przy jednoczesnym braku aktywności 1,2-dioksygenazy katecholowej i 4,5-dioksygenazy

protokatecholowej. Natomiast 2,3-dioksygenaza katecholowa była aktywna tylko w układach zawierających 4-nitrofenol. Również Guzik i in. [107] badając szczep *S. maltophilia* KB2 podczas degradacji związków monoaromatycznych stwierdzili aktywność trzech różnych dioksygenaz, w zależności od substratu wykorzystanego do indukcji aktywności enzymów. Można zatem przypuszczać, że różnice w aktywności badanych enzymów w przypadku szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolityca* M03 i *A. calcoaceticus* M1B eksponowanych na różne węglowodory mogły być związane ze zróżnicowaną aktywnością aparatu enzymatycznego poszczególnych szczepów w zależności od dostarczonych substratów. Ponadto, bardzo niska aktywność badanych dioksygenaz, szczególnie w przypadku szczepu *A. calcoaceticus* M1B, może być związana z aktywacją szlaków degradacji węglowodorów działających w oparciu o enzymy z grupy monooksygenaz lub wchodzące w skład cytochromu P450 [142,143]. Badania prowadzone przez Lal i Khanna [144] wykazały aktywność hydroksylazy w początkowym etapie degradacji alkanów przez szczep *Acinetobacter calcoaceticus* (degradacja terminalna), natomiast szczep *Rhodococcus* był również zdolny do prowadzenia degradacji subterminalnej, z udziałem monooksygenazy alkanowej [145]. Ponadto, Mishra i Singh [146] analizując degradację heksadekanu przez komórki szczepów *Pseudomonas aeruginosa* PSA5, *Rhodococcus* sp. NJ2 oraz *Ochrobactrum intermedium* P2 zaobserwowali zróżnicowaną aktywność zarówno hydroksylazy alkanowej, dehydrogenazy alkoholowej oraz lipazy w zależności od czasu, a maksimum aktywności badanych enzymów występowało w 2, 4, 6 lub 8 dniu degradacji heksadeanu. Biorąc to pod uwagę, należy uwzględnić, że znaczące różnice w aktywności badanych w niniejszej pracy enzymów występujące pomiędzy poszczególnymi szczepami mogą być więc związane również z pobieraniem prób do analiza aktywności badanych enzymów w jednym terminie, przez co maksimum aktywności badanych biokatalizatrów mogło zostać pominięte.

3. Szczegółowa analiza zmian właściwości komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne

Zaobserwowane zmiany właściwości powierzchniowych komórek, a także przepuszczalności błon i aktywności wybranych białek enzymatycznych spowodowały podjęcie bardziej szczegółowych analiz pozwalających na określenie modyfikacji zachodzących na poziomie błony komórkowej, profilu białkowego oraz zmian

w materiale genetycznym badanych mikroorganizmów. Ponieważ największe modyfikacje komórek zachodziły pod wpływem ekspozycji na węglowodory aromatyczne szczepy eksponowane na te związki zostały poddane wnikliwym analizom z wykorzystaniem metod biologii molekularnej.

3.1. Analiza porównawcza profili błonowych kwasów tłuszczowych

Błona komórkowa komórek bakteryjnych zbudowana jest z dwuwartswy lipidowej, w której zakotwiczone są białka błonowe i inne struktury komórkowe. Dwuwarstwę lipidową tworzą głównie fosfolipidy, pochodne kwasu fosfatydylowego, zbudowane z glicerolowego rdzenia zestryfikowanego dwoma cząsteczkami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i kwasem fosforowym [147]. Struktura błonowych kwasów tłuszczowych determinuje płynność membrany, oddziałując na jej przepuszczalność, transport aktywny przez błonę oraz interakcje międzybiałkowe [148]. W przeprowadzonych testach zbadano zmiany profilu błonowych kwasów tłuszczowych, w zależności od substratów wzrostowych dostarczanych mikroorganizmom. Wyniki badań udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych w strukturze membrany komórek bakterii hodowanych na glukozie lub eksponowanych na węglowodory aromatyczne zaprezentowano w Tabeli III. 7.

Do opisu poszczególnych kwasów tłuszczowych wykorzystano często stosowany w literaturze zapis skrócony (np. 14:0 *izo*, 16:1 ω7c). Liczba przed dwukropkiem oznacza ilość atomów węgla w cząsteczce kwasu tłuszczowego. Natomiast cyfra po dwukropku określa liczbę wiązań podwójnych w łańcuchu. W izomerach *izo* grupa metylowa podstawiona jest przy drugim od końca metylowego węglu łańcucha acylowego, a w postaci *anteizo* – przy trzecim. Kwasy zawierające grupę cyklopropanową oznaczone są skrótem *cyklo*. Określenie aldehyd oznacza aldehyd odpowiedniego kwasu tłuszczowego. Położenie wiązania podwójnego oznaczane jest przez podanie numeru węgla (liczonego od końca metylowego) przy którym się znajduje wraz z konformacją *cis* lub *trans*. Hydroksykwasy tłuszczowe oznaczone są symbolami 2OH i 3OH, reprezentujące kwasy posiadające grupę hydroksylową przy odpowiednio drugim i trzecim atomie węgla licząc od grupy karbonylowej.

Tabela III. 7. Procentowy udział wyszczególnionych kwasów tłuszczowych po 12 miesiącach ekspozycji w strukturze błony komórkowej bakterii z próby kontrolnej (hodowanych na glukozie) oraz eksponowanych na węglowodory aromatyczne szczepów *R. planticola* (M01), *R. ornithinolytica* (M03) oraz *A. calcoaceticus* (M1B)

Kwas tłuszczowy	% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych					
	próba kontrolna	węglowodory aromatyczne	próba kontrolna	węglowodory aromatyczne	próba kontrolna	węglowodory aromatyczne
	M01		**M03**		**M1B**	
Nasycone						
10:0 3OH	1,57 ± 0,41	3,76 ± 0,08	1,79 ± 0,52	3,69 ± 0,06	2,27 ± 0,49	3,76 ± 0,01
12:0	1,81 ± 0,20	3,16 ± 0,03	1,54 ± 0,27	2,84 ± 0,26	1,87 ± 0,17	3,00 ± 0,02
12:0 *aldehyd*	-	-	2,20 ± 1,26	-	2,02 ± 0,83	-
12:0 2OH	2,37 ± 0,21	4,34 ± 0,18	2,70 ± 0,16	4,32 ± 0,02	2,91 ± 0,05	4,45 ± 0,01
12:0 3OH	1,18 ± 0,12	2,52 ± 0,37	1,15 ± 0,53	2,48 ± 0,04	1,72 ± 0,23	2,63 ± 0,06
14:0	2,35 ± 0,55	0,62 ± 0,34	2,29 ± 1,18	0,53 ± 0,27	1,93 ± 0,51	0,44 ± 0,01
15:0 *izo*	0,53 ± 0,26	-	0,33 ± 0,04	-	-	-
15:0 *anteizo*	1,11 ± 0,75	-	-	0,31 ± 0,01	-	0,26 ± 0,02
16:0	29,54 ± 2,02	27,63 ± 0,10	27,43 ± 3,89	27,66 ± 0,10	26,86 ± 2,47	26,85 ± 0,09
17:0 *anteizo*	0,88 ± 0,57	0,61 ± 0,42	0,48 ± 0,17	0,43 ± 0,21	-	-
17:0 *cyklo*	8,98 ± 2,56	2,53 ± 0,05	8,46 ± 2,18	2,26 ± 0,20	7,62 ± 2,48	2,01 ± 0,03
18:0	3,14 ± 1,82	1,79 ± 0,54	1,90 ± 0,36	0,92 ± 0,13	1,91 ± 0,51	-
19:0 *cyklo w8c*	2,50 ± 1,15	-	2,29 ± 1,39	-	2,26 ± 0,66	-
Nienasycone						
16:1 *izo*/14:0 3OH	1,63 ± 0,68	-	2,05 ± 1,40	-	1,75 ± 0,64	-
16:1 *ω6c*/16:1 *ω7c*	13,00 ± 6,25	29,65 ± 0,80	8,22 ± 0,34	30,83 ± 0,74	13,44 ± 3,41	31,28 ± 0,06
17:1 *izo ω9c*	1,69 ± 1,35	-	-	-	-	-
18:1 *ω6c*/18:1 *ω7c*	27,37 ± 4,94	15,74 ± 0,22	28,90 ± 2,08	23,37 ± 0,37	33,96 ± 2,77	24,01 ± 0,15
Stosunek kwasów nasyconych do nienasyconych	1,30 ± 0,07	0,90 ± 0,04	1,11 ± 0,06	0,84 ± 0,04	1,05 ± 0,05	0,80 ± 0,04

Zaprezentowane wyniki wskazują na wyraźne różnice w składzie oraz stosunku nasyconych i nienasyconych błonowych kwasów tłuszczowych bakterii wzrastających na podłożu zawierającym glukozę lub węglowodory aromatyczne. Rezultaty przeprowadzonych badań wskazują na duży wzrost zawartości kwasów nienasyconych w błonie komórek eksponowanych na związki hydrofobowe (np. dla badanych szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B były to wzrosty udziałów procentowych kwasu 16:1 *ω6c*/16:1 *ω7c:* z 13,0 do 29,7%; z 8,2 do 30,8% oraz z 13,4 do 31,3%) (Tabela III. 7). Wpływało to w sposób znaczący na właściwości i płynność błony komórek badanych szczepów. Tendencja ta jest widoczna wśród wszystkich badanych mikroorganizmów, niezależnie od gatunku.

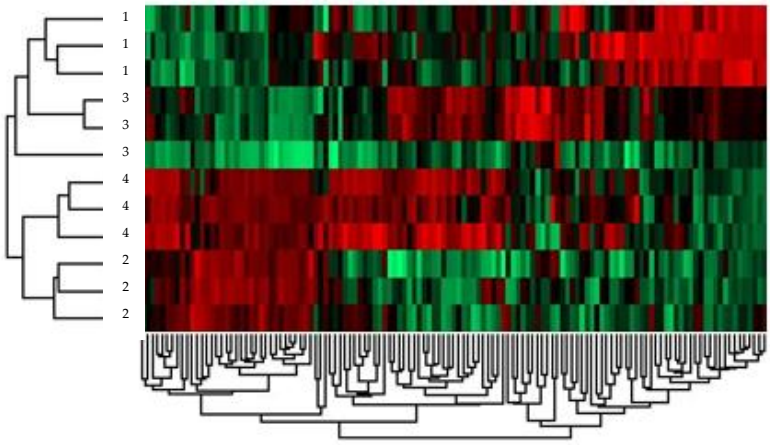
Wszystkie bakterie wzrastające na podłożu zawierającym glukozę posiadały w strukturze swojej błony komórkowej kwas 3-hydroksypentadekanowy (C15:0 *anteizo*), *cis*-10,11-metyleno-oktadekanowy (C19:0 *cyklo* w8c) oraz 14-metylo-pentadekanowy lub 3-hydroksytetradekanowy (16:1 *izo*/14:0 3OH). Ponadto, wzrastające na podłożu zawierającym glukozę bakterie szczepów *R. planticola* M01 i R. *ornithinolytica* M03 charakteryzowały się obecnością niewielkiej ilości kwasu 13 metylo-tetradekanowego (około 13 %), natomiast szczepy *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* posiadały w swojej strukturze dodekanal (12:0 *aldehyd,* odpowiednio 2,2 i 2,0%). Bakterie szczepu *R. platicola* M01 jako jedyne wykazywały obecność w błonie komórek hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy kwasu 15-metylo-9-heksadekanowego (17:1 *izo w9c*, niespełna 2%), z kolei komórki szczepu *A. calcoaceticus* M1B nie produkowały kwasu 14-metylo-heksadekanowego (17:0 *anteizo*). Mikroorganizmy eksponowane na związki hydrofobowe zwiększały udział hydroksykwasów oraz zmniejszały zawartość *izo-* i *anteizo-* rozgałęzionych kwasów tłuszczowych. W błonie tych komórek zmniejszała się również zawartość kwasu tetradekanowego (14:0 z około 2% do około 0,5% dla wszystkich badanych komórek), *cis*-9,10-metyleno-heksadekanowego (17:0 *cyklo*) i oktadekanowego (18:0). Obserwowane jest również zmniejszenie ilości kwasów 18:1 w6c/18:1 w7c. Najistotniejszy spadek odnotowano dla komórek szczepu *R. planticola* M01, gdzie ilość 18:1 *w*6c/18:1 *w7c* zmniejszyła się z 27,4% do 15,7%. Dla pozostałych badanych szczepów zmniejszenie ilości kwasu 18:1 *w*6c/18:1 *w7c* w wyniku ekspozycji komórek na węglowodory aromatyczne nie przekraczało 10 pkt. % (z 28,9% do 23,4% dla szczepu *R. ornithinolytica* M03 oraz z 34,0% do 24,0% dla szczepu *A. calcoaceticus* M1B).

3.2. **Modyfikacje profilu białkowego komórek**

W kolejnym etapie badań przeprowadzono wnikliwe analizy porównawcze modyfikacji profilu białkowego komórek hodowanych na podłożu zwierającym glukozę lub mieszaninę węglowodorów aromatycznych. W badaniach analizowano komórki nieeksponowane (z hodowli z dodatkiem glukozy jako źródła węgla, oznaczone na wykresach *heat map* numerem **4**) oraz eksponowane przez 12 miesięcy na wybrane węglowodory aromatyczne (oznaczone na wykresach *heat map* numerem **1)**. Przeanalizowano również szybkość odpowiedzi komórkowej na dodatek węglowodorów aromatycznych w hodowli (ekspozycja komórek na węglowodory przez 7 dni, oznaczone na wykresach *heat map*

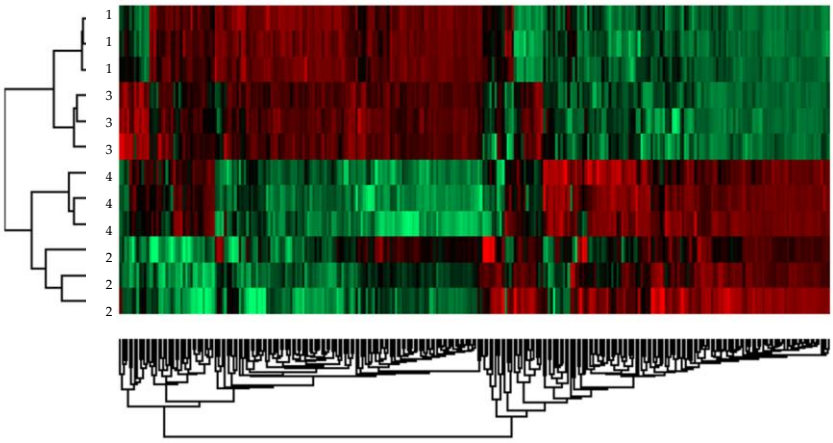
numerem **2**) oraz trwałość zmian indukowanych indukowanych ekspozycją na badane węglowodory aromatyczne (transfer komórek po 12-miesięcznej ekspozycji na podłoże z glukozą i hodowla przez 7 dni, oznaczone na wykresach *heat map* numerem **3**). Wyizolowane białka poddano identyfikacji z wykorzystaniem nanochromatografii cieczowej ze spektrometrią mas, a uzyskane dane analizowano w programie MaxQuant (wersja 1.5.1.2.) (Rysunki III. 9-11).

Szczep *Raoultella planticola* M01



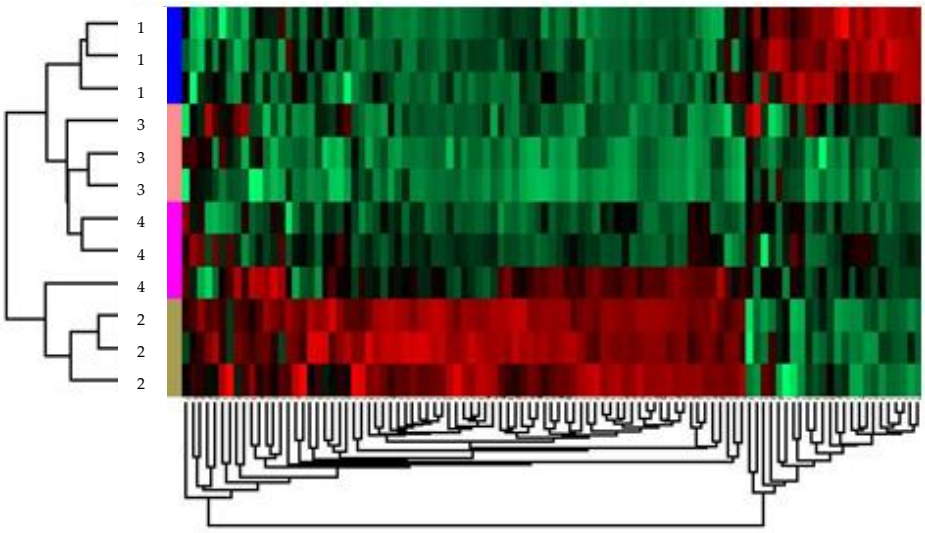
Rysunek III. 9. Wykres typu heat map, przedstawiający wyniki hierarchicznego klasteringu białek wyizolowanych z komórek szczepu *R. planticola* M01. Oznaczenie próbek: (1) bakterie hodowane na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych; (2), bakterie hodowlane przez 12 miesięcy na podłożu z dodatkiem glukozy i przeniesione na podłoże z dodatkiem węglowodorów aromatycznych na 7 dni; (3) bakterie hodowane przez 12 miesięcy na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych i przeniesione na 7 dni na podłoże dodatkiem glukozy; (4) bakterie hodowlane na podłożu z dodatkiem glukozy

Szczep *Raoultella ornithinolytica* M03



Rysunek III. 10. Wykres typu heat map, przedstawiający wyniki hierarchicznego klasteringu białek wyizolowanych z komórek szczepu *R. ornithinolytica* M03. Oznaczenie próbek: (1) bakterie hodowane na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych (2) bakterie hodowlane przez 12 miesięcy na podłożu z dodatkiem glukozy i przeniesione na podłoże z dodatkiem węglowodorów aromatycznych na 7 dni; (3) bakterie hodowane przez 12 miesięcy na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych i przeniesione na 7 dni na podłoże dodatkiem glukozy; (4) bakterie hodowlane na podłożu z dodatkiem glukozy

Szczep *Acinetobacter calcoaceticus* M1B



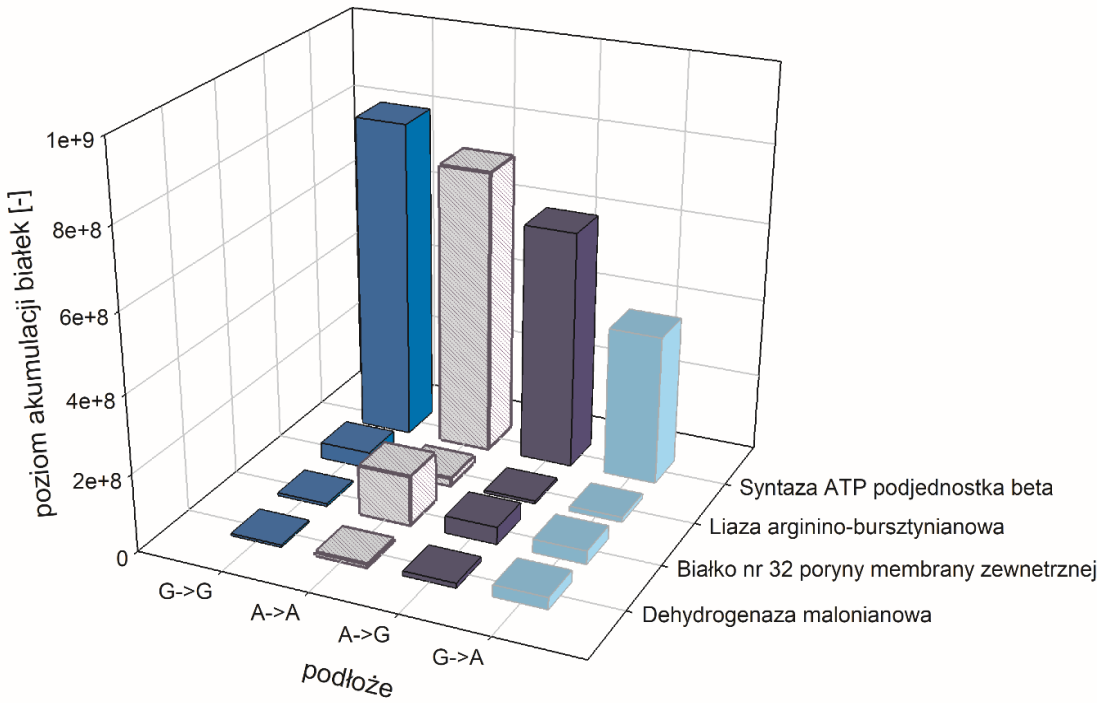
Rysunek III. 11. Wykres typu heat map, przedstawiający wyniki hierarchicznego klasteringu białek wyizolowanych z komórek szczepu *A. calcoaceticus* M1B. Oznaczenie próbek: (1) bakterie hodowane na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych (2) bakterie hodowlane przez 12 miesięcy na podłożu z dodatkiem glukozy i przeniesione na podłoże z dodatkiem węglowodorów aromatycznych na 7 dni; (3) bakterie hodowane przez 12 miesięcy na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych i przeniesione na 7 dni na podłoże dodatkiem glukozy; (4) bakterie hodowlane na podłożu z dodatkiem glukozy

Wyniki hierarchicznego klasteringu białek wyizolowanych z bakterii eksponowanych na węglowodory aromatyczne wskazują na znaczące różnice w poziomie ekspresji białek w komórkach szczepów wzrastających na podłożu z dodatkiem związków aromatycznych w porównaniu do prób nieeksponowanych. Największe zmiany poziomu ekspresji białek odnotowano dla komórek eksponowanych prze 12 miesięcy na węglowodory aromatyczne. Ponadto, mikroorganizmy szczepów *R. planticola* M01 i *R. ornithinolytica* M03 nieeksponowane i przeniesione na podłoże zawierające węglowodory aromatyczne na 7 dni (krótkotrwała ekspozycja) wykazywały zbliżony profil ekspresji białek do komórek poddanych długotrwałej ekspozycji. Dodatkowo, wyniki uzyskane dla układów poddanych 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne a następnie przeniesionych na podłoża z dodatkiem glukozy (oznaczone numerem 3 na Rysunkach III. 9-11) pozwoliły stwierdzić stosunkowo niewielką trwałość modyfikacji wywołanych 12-miesięczną ekspozycją na węglowodory aromatyczne.

Przykłady białek o zmodyfikowanej ekspresji odnotowane w poszczególnych próbkach zostały zaprezentowane na Rysunkach III. 12-14. Przedstawione na wykresach białka (syntetaza ATP, białko nr 32 poryny membrany zewnętrznej, liaza arginio-bursztynianowa oraz dehydrogenaza malonianowa) są zaangażowane w różnorodne procesy

w komórkach bakterii, reprezentując szeroki przekrój zmian w mikroorganizmach pod wpływem działania czynników stresowych. Proteiny te biorą udział w procesach transkrypcji, translacji i fałdowania białek, biorą udział w metabolizmie energetycznym komórki oraz przekształcaniu aminokwasów i cząstek o małych masach.

Na Rysunku III. 12 zaprezentowano wyniki pomiarów poziomów akumulacji wybranych białek wyizolowanych z komórek szczepu *R. planticola* M01 nieeksponowanych (G->G), poddanych 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne (A->A); przeniesionych po 12-miesięcznej ekspozycji na podłoże z dodatkiem glukozy (A->G) oraz poddanych 7-dniowej ekspozycji na węglowodory aromatyczne (G->A).

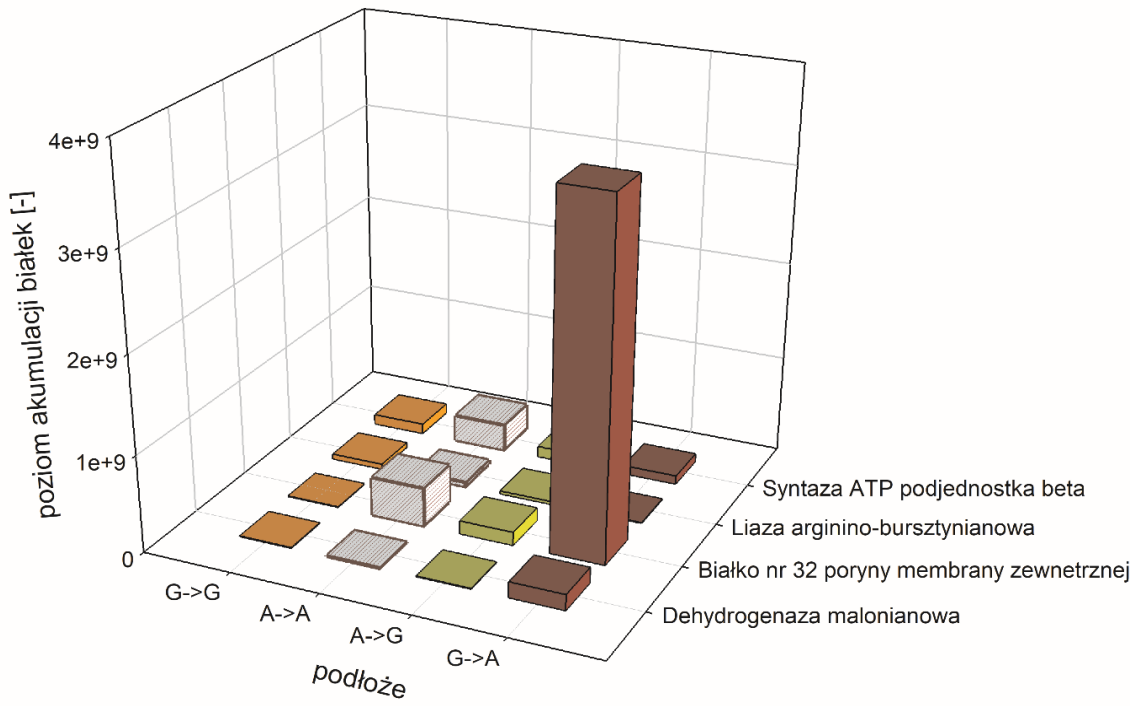


Rysunek III. 12. Poziomy akumulacji wybranych białek, wyizolowanych z komórek szczepu *R. planticola* M01, gdzie: G->G – komórki utrzymywane stale na podłożu z glukozą; A->A – komórki utrzymywane stale na podłożu z węglowodorami aromatycznymi; A->G – komórki eksponowane przez 12 miesięcy na węglowodory aromatycnze i przeniesione na podłoże z glukozą na 7 dni; G->A – komórki utrzymywane na podłożu z glukozą przez 12 miesięcy i przeniesione na podłoże z dodoatkiem węglowodorów aromatycznych na 7 dni

Wyniki badań wskazują na spadek aktywności syntetazy ATP oraz liazy arginino-bursztynianowej w komórkach szczepu *R. planticola* M01 poddanych 7-dniowej ekspozycji w porównaniu do komórek poddanych 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne. Ponadto, w komórkach eksponowanych przez 12 miesięcy na węglowodory

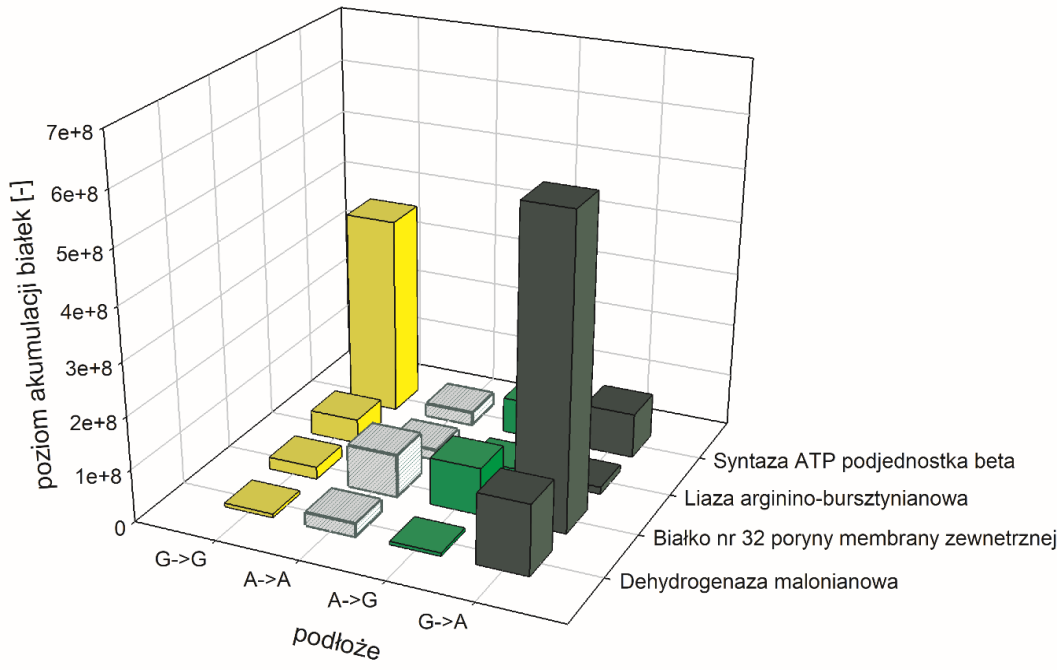
aromatyczne uwagę zwraca również znacznie podwyższona aktywność białka 32 poryny membranowej, zaangażowanego w procesy aktywnego transportu substancji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki. Należy również zwrócić uwagę, że najwyższy poziom dehydrogenazy malonianowej odnotowano w próbkach poddanych 7-dniowej ekspozycji na węglowodory aromatyczne. Może to być związane z procesami metabolizowania zanieczyszczeń węglowodorowych przez te komórki.

Przedsatwione na Rysunku III. 13 wyniki pomiarów poziomów akumulacji białek wyizolowanych z mikroorganizmów szczepu *R. ornithinolytica* M03 charakteryzowały się bardzo wysokim poziomem akumulacji białek związanych z aktywnym transportem zanieczyszczeń w komórkach poddanych krótkotrwałej ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe.



Rysunek III. 13. Poziomy akumulacji wybranych białek, wyizolowanych z komórek szczepu *R. ornithinolytica* M03, gdzie: G->G – komórki utrzymywane stale na podłożu z glukozą; A->A – komórki utrzymywane stale na podłożu z węglowodorami aromatycznymi; A->G – komórki eksponowane przez 12 miesięcy na węglowodory aromatycznze i przeniesione na podłoże z glukozą na 7 dni; G->A – komórki utrzymywane na podłożu z glukozą przez 12 miesięcy i przeniesione na podłoże z dodoatkiem węglowodorów aromatycznych na 7 dni

Warto jednak zwrócić uwagę, że intensywna transkrypcja i translacja białek transportowych była połączona z nieznacznie zwiększonym poziomem akumulacji białka syntetazy ATP. Zwiększenie akumulacji białka poryny membranowej w stosunku do komórek nieeksponowanych odnotowano także w przypadku bakterii szczepu *R. ornithinolytica* M03 poddanych 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne. Było ono powiązane z porównywalnym poziomem akumulacji białek syntetazy ATP. Należy również zauważyć, że bakterie przeniesione po 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory na podłoże z dodatkiem glukozy przeprowadzają „powrotne" modyfikacje profilu białkowego w stronę profilu komórek wzrastających stale na glukozie, który charakteryzuje się mniejszym zapotrzebowaniem energetycznym. Warto również zwrócić uwagę na zwiększoną ilość dehydrogenazy malonianowej, enzymu związanego z komórkowymi procesami metabolicznymi, w bakteriach poddanych 7-dniowej ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe.



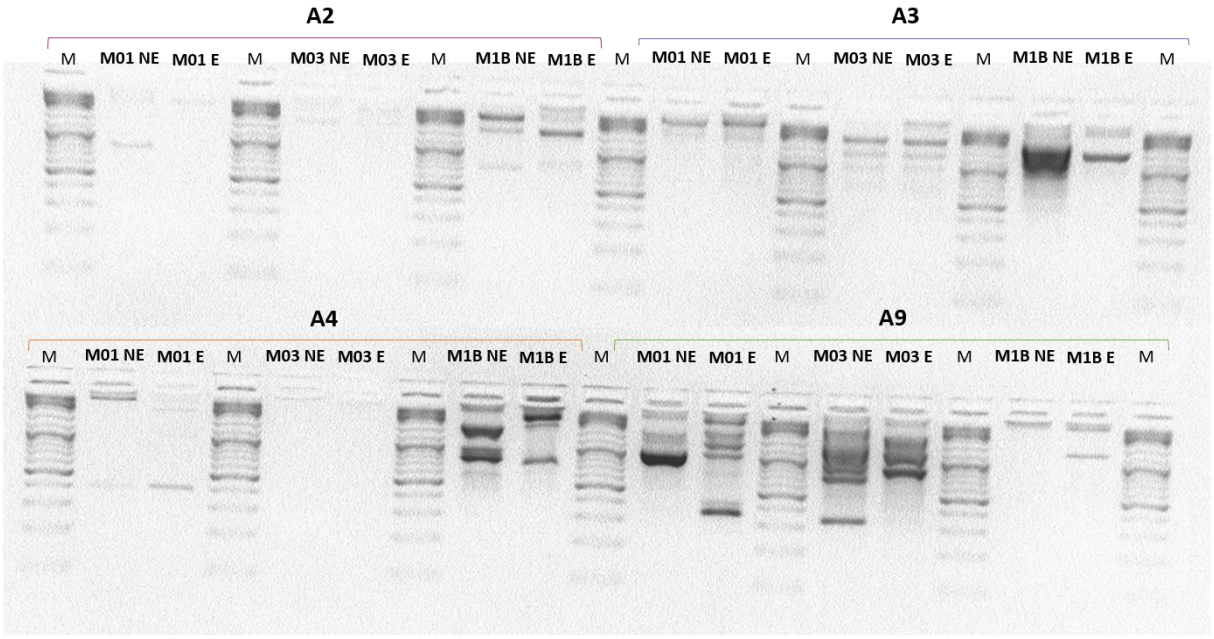
Rysunek III. 14. Poziomy akumulacji wybranych białek, wyizolowanych z komórek szczepu *A. calcoaceticus* M1B, gdzie: G->G – komórki utrzymywane stale na podłożu z glukozą; A->A – komórki utrzymywane stale na podłożu z węglowodorami aromatycznymi; A->G – komórki eksponowane przez 12 miesięcy na węglowodory aromatycznze i przeniesione na podłoże z glukozą na 7 dni; G->A – komórki utrzymywane na podłożu z glukozą przez 12 miesięcy i przeniesione na podłoże z dodoatkiem węglowodorów aromatycznych na 7 dni

Również komórki szczepu *A. calcoaceticus* M1B poddane 7-dniowej ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe wykazywały wyraźnie zwiększony poziom akumulacji białek poryny membranowej (Rysunek III. 14). Bakterie te charakteryzowały się również podwyższonym poziomem akumulacji białek związanych z degradowaniem zanieczyszczeń oraz metabolizmem energetycznym komórek.

Bakterie *A. calcoaceticus* M1B poddane 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne, a także komórki przeniesione po 12-miesięczenj ekspozycji na związki aromatyczne do hodowli z dodatkiem glukozy również wykazywały zwiększone poziomy akumulacji białek związanych z komórkowymi procesami metabolicznymi oraz energetycznymi. Jednak różnice w poziomach akumulacji tych protein w komórkach eksponowanych nie były aż tak duże w porównaniu do komórek nieeksponowanych i wynosiły około 20 pkt.%. Badany szczep hodowany na podłożu z dodatkiem glukozy wykazywały wysoki poziom akumulacji białek związanych z metabolizmem energetycznym komórek, przy jednoczesnym znacząco niższym poziomie akumulacji innych białek, związanych z procesami transportowymi, degradacyjnymi czy syntezy i fałdowania nowych białek.

3.3. Analiza losowych amplifikacji polimorficznego DNA (PCR-RAPD)

Zakres prowadzonych prac obejmował także przeprowadzenie analiz molekularnych próbek, w celu zbadania poziomu odpowiedzi komórkowej, który zostaje aktywowany w wyniku odpowiedzi komórek na ekspozycję na węglowodory aromatyczne. Ze względu na ograniczone dane literaturowe prezentowane przez zespoły badające podłoże molekularne tego typu zmian oraz brak zdefiniowanych specyficznych sekwencji celowych i primerów dla badanych szczepów, zdecydowano się na wykorzystanie techniki losowych amplifikacji polimorficznego DNA. Pozwala ona na wstępne zaobserwowanie zmian zachodzących w ekspresji poszczególnych fragmentów sekwencji nukleotydowej dzięki stosunkowo niewielkiej specyficzności wykorzystywanych starterów. Badania te prowadzono dla komórek hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy oraz eksponowanych na węglowodory aromatyczne przez 12 miesięcy, ze względu na zaobserwowaną na podstawie profilu białkowego nieutrwaloną modyfikację bakterii poddanych krótkotrwałej ekspozycji na węglowodory aromatyczne lub przenoszonych po ekspozycji na podłoże z dodatkiem glukozy. Wyniki przeprowadzonych analiz przedstawiono na Rysunku III. 15.



Rysunek III. 15. Zdjęcie żelu po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji PCR uzyskanych w wyniku amplifikacji DNA wyizolowanego ze szczepów: *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 oraz *A. calcoaceticus* M1B, ze starterami A2, A3, A4, A9, gdzie: M – marker wielkości DNA; M01, M03, M1B – odpowiednie szczepy mikroorganizmów; NE – linia utrzymywana na podłożu z dodatkiem glukozy; E – linia utrzymywana na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych

Zdjęcia żelu po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji PCR-RAPD uwidaczniają znaczące modyfikacje w aktywności ekspresji fragmentów materiału genetycznego bakterii w wyniku ekspozycji komórek na węglowodory aromatyczne. Na Rysunku III. 15 przedstawiono wyniki uzyskane dla 4 spośród 80 testowanych starterów, gdzie różnice w ekspresji były najbardziej widoczne. Na podstawie przedstawionych wyników można stwierdzić, że aktywność transkrypcyjna materiału genetycznego wszystkich badanych szczepów zmieniła się pod wpływem długotrwałej ekspozycji na węglowodory aromatyczne, jednak każdy z badanych szczepów wykazywał inny profil zmian genetycznych. Najbardziej różnicujący spośród badanych był starter A9, dla którego różnice w ekspresji obserwowano dla wszystkich badanych szczepów, natomiast najmniej różnic obserwowano w reakcjach przeprowadzonych z wykorzystaniem startera A3. Warto również podkreślić znaczące różnice w uzyskanych wynikach zaobserwowane dla szczepów *R. planticola* M01 i *R. ornithinolytica* M03, należących do tego samego rodzaju.

3.4. Dyskusja wyników

Długotrwała ekspozycja na zanieczyszczenia węglowodorowe w znaczącym stopniu wpływa nie tylko na modyfikacje właściwości powierzchniowych mikroorganizmów, ale powoduje również indukcję zaawansowanych mechanizmów przystosowawczych i obronnych. Pogłębiona analiza właściwości komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne wskazuje na znaczące zmiany zachodzące w budowie błony komórkowej, proteomie oraz aktywności transkrypcyjnej bakteryjnego genomu.

Analizując wpływ zanieczyszczeń węglowodorowych na komórki należy zwrócić uwagę, na wpływ tych związków na strukturę błony komórkowej. Membrana ta, jako główna bariera oddzielająca komórkę od środowiska zewnętrznego pełni niezwykle ważną funkcję w utrzymaniu homeostazy organizmów jednokomórkowych, więc utrzymanie jej prawidłowych parametrów jest czynnikiem krytycznym dla bakterii [148]. Jak zauważyli Sikkema i in. [40], toksyczność substancji hydrofobowych w stosunku do komórek wzrasta wraz ze wzrostem ich lotności i spadkiem lepkości tych cząstek. Powoduje to, że frakcje ropy naftowej o niskiej temperaturze wrzenia, zawierające np. benzen, toluen i ksylen, są bardziej szkodliwe dla komórek bakterii niż związki wielkocząsteczkowe. Ksenobiotyki interkalujące błonę komórkową mogą oddziaływać z łańuchami acylowymi kwasów tłuszczowych lub umiejscawiać się pomiędzy przeciwległymi powierzchniami dwuwarstwy, zaburzając jej strukturę. Obecność takich interkalacji powoduje zwiększenie płynności membrany, której niekorzystnym skutkom mikroorganizmy starają się przeciwdziałać poprzez syntezę *de novo* kwasów tłuszczowych; zmianę proporcji izomerów *cis*/*trans*, *izo*/*anteizo* oraz ilości cyklicznych i nienasyconych kwasów tłuszczowych; modyfikacje długości łańcucha kwasów tłuszczowych czy wreszcie zmianę struktury membranowych białek i fosfolipidów [149–152].

W literaturze opisywane są obserwacje zmniejszania długości łańcucha kwasów tłuszczowych w komórkach eksponowanych na niekorzystne warunki środowiska [153], czy zanieczyszczenia organiczne [154,155]. Jako jeden z najlepiej przeanalizowanych mechanizmów obronnych komórek przeciwko niekorzystnemu zwiększaniu płynności błony komórkowej opisywana jest izomeryzacja *cis*/*trans* błonowych kwasów tłuszczowych [40]. Dzięki zmianie konfiguracji sterycznej cząsteczki w wyniku izomeryzacji *cis*/*trans*, możliwe jest gęstsze upakowanie łańcuchów lipidowych w błonie komórkowej, co wpływa korzystnie na zmniejszenie płynności membrany. Ponadto, *trans* kwasy tłuszczowe charakteryzują się

wyższą temperaturą topnienia, wpływając tym samym na podniesienie temperatury przejścia fazowego. Aktywacja izomeraz *cis*/*trans* została zaobserwowana m. in. przez Heipieper i in. [156] badających odpowiedź komórek *Pseudomonas putida* S12 na dodatek 3-nitrotoluenu w różnych stężeniach. Należy podkreślić, że jest to szybka odpowiedź komórki na warunki stresowe, pozwalająca na zmniejszenie płynności błony w krótkim czasie i zabezpieczenie komórki przed niekorzystnymi czynnikami [157,158]. Synteza *trans* nienasyconych kwasów tłuszczowych na drodze izomeryzacji ich *cis* odpowiedników może być rozpoczęta w ciągu 5 min od wystąpienia czynnika stresowego, a zakończona już 30 min później, podczas gdy saturacja łańcuchów kwasów tłuszczowych rozpoczynała się dopiero 15 min po ekspozycji komórek na ksenobiotyki [157,159]. Można zatem wnioskować, że przedstawiony w niniejszej pracy znaczący udział nienasyconych kwasów tłuszczowych *cis* w profilu błonowym może być wynikiem działania mechanizmu obronnego komórek w oparciu o desaturację kwasów tłuszczowych, pod wpływem długotrwałej, 12-miesięcznej ekspozycji na czynnik stresowy.

Wzrost udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych w profilu membran komórek narażanych na kontakt z zanieczyszczeniami węglowodorowymi został odnotowany przez wielu badaczy i, w przeciwieństwie do izomeryzacji *cis*/*trans*, jest uznawany za długofalową odpowiedź komórki na obecność rozpuszczalników organicznych w środowisku [40,154,160]. Zmiany tego parametru w komórkach *E. coli* odnotował Ingram [161], podczas ich ekspozycji na długołańcuchowe alkohole i węglowodory aromatyczne oraz Zhila i in. [160] badając zmiany profilu kwasów tłuszczowych komórek *Cupriavidus eutrophus* B-10646 rosnącego na podłożu z dodatkiem glukozy, kwasu oleinowego lub oleju z nasion słonecznika. Przebadane w ramach niniejszej pracy mikroorganizmy również charakteryzowały się wzrostem liczby nienasyconych błonowych kwasów tłuszczowych o około 5-10%. Największe zmiany zaobserwowano w przypadku szczepu *R. planticola* M01, gdzie ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych wzrosła z 43,69% do 52,65% całkowitej ilości wyizolowanych kwasów tłuszczowych. Mechanizm tych przemian może polegać na syntezie kwasów tłuszczowych *de novo* [154] lub ich desaturacji z udziałem specyficznych desaturaz (w warunkach tlenowych) [153,162].

Ponadto, podobnie jak w przypadku szczepu *Cupriavidus eutrophus* B-10646 badanego przez Zhila i in. [160], badane w niniejszej pracy mikroorganizmy charakteryzowały się ograniczoną różnorodnością kwasów tłuszczowych, która obejmowała kwasy nasycone,

hydroksykwasy, cykliczne kwasy i kwasy mononienasycone o długości łańcucha C:10-C:18. We wszystkich badanych próbkach widoczny był również wzrost ilości hydroksykwasów, osiągając wartość ponad 10% całkowitej ilości wyizolowanych kwasów tłuszczowych, w porównaniu do początkowych wartości oscylujących w granicach 6%. Modyfikacja ta jest również przypisywana działaniom komórki w kierunku obniżenia płynności membrany [163].

Szeroko komentowane są również modyfikacje polegające na zmniejszeniu zawartości kwasów tłuszczowych zmetylowanych w pozycji *anteizo*, ze względu na większą powierzchnię zajmowaną przez te cząsteczki. Zmiana pozycji grupy metylowej pozwala na gęstsze upakowanie fosfolipidów w membranie i zmniejszenie jej płynności. Należy jednak zauważyć, że zmetylowane kwasy tłuszczowe występują głównie w bakteriach gram-dodatnich oraz beztlenowych [164–166]. Niemniej jednak, mogą być także identyfikowane w komórkach szczepów gram-ujemnych, jak np. *Pseudomonas* sp. ORAs5, *P. putida* czy *P. stutzeri* [150,165]. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano niewielką ilość zmetylowanych błonowych kwasów tłuszczowych w próbkach szczepów *R. ornithinolytica* M03 oraz *A. calcoaceticus* M1B, jednak ich ilość malała w wyniku ekspozycji na węglowodory aromatyczne. Dla badanych mikroorganizmów zaobserwowano również zmniejszenie ilości cyklopropanowych kwasów tłuszczowych (17:0 cyklo i 19:0 cyklo) w porównaniu do próby kontrolnej. Rola kwasów cyklopropanowych w strukturze błony komórkowej nie została jeszcze dobrze poznana, jednak niektórzy badacze sugerują, że obecność tych związków zmniejsza przepuszczalność membrany w stosunku do protonów, co może być szczególnie korzystne w przypadku ekspozycji bakterii na WWA, fenol, czy polichlorowane bifenole [167–170]. Mrozik i in. [149,150] wykazali znaczący spadek ilości cyklopropanowanych kwasów w strukturze błon komórek *P. putida* i *P. stutzeri* w hodowli z naftalenem. Może być to związane z dużym wpływem cyklopropanowanych kwasów na mobilność błony komórkowej oraz ułożenie łańcuchów acylowych, powodując znaczącą zmianę właściwości chemicznych membrany [171]. Należy również wspomnieć, że zwiększanie płynności błony komórkowej jest w niektórych przypadkach pożądanym mechanizmem reakcji komórek bakterii na obecność niekorzystnych warunków w środowisku i było ono obserwowane w przypadku mikroorganizmów charakteryzujących równoczesnym się wzrostem hydrofobowości powierzchni komórek. Zmiany tego typu zostały odnotowane w komórkach *Listeria innocua* przechowywanych w niskiej temperaturze

(10°C) i skutkowały zwiększeniem ilości nienasyconych kwasów C18:1 oraz wzrostem proporcji kwasów krótkołańcuchowych do długołańcuchowych (C15:0-C17:0), powodując obniżenie temperatury topnienia i przejścia fazowego błony komórkowej [172].

Istotnymi elementami mechanizmów przystosowawczych komórek bakterii są zmiany aktywności odpowiednich genów, przemodelowanie profilu białkowego i modyfikacje proteolizy, pozwalające utrzymać komórkom bakterii przewagę nad innymi mikroorganizmami. Kompetycja zachodząca w zmieniającym się środowisku między różnymi grupami mikroorganizmów wymusza na bakteriach indukowanie szybkiej oraz efektywnej pod względem energetycznym i metabolicznym reakcji na działanie czynników stresowych. [173]. W literaturze opisywane są różnorodne zmiany proteomiczne w bakteriach eksponowanych na czynniki stresowe, jednak główne szlaki odpowiedzi komórkowej skupiają się na utrzymaniu odpowiedniej homeostazy błony komórkowej oraz zwiększeniu aktywności czynników transkrypcyjnych i odpowiedzialnych za fałdowanie białek (głównie chaperonów i białek szoku cieplnego), przy jednoczesnym dostarczeniu odpowiedniej ilości energii do przeprowadzenia niezbędnych przemian [173,174]. Bakterie gram-ujemne posiadają wyspecjalizowane białka, aktywujące odpowiednie szlaki odpowiedzi komórkowej w wyniku działania czynnika stresowego, a badania przeprowadzone przez Domínguez-Cuevas i in. [175] wskazują na zbieżność reakcji komórki na akumulację niesfałdowanych białek w wyniku ekspozycji na węglowodory z odpowiedzią mikroorganizmów na szok cieplny.

Do białek odpowiedzi komórkowej należy zaliczyć proteiny związane z monitorowaniem stanu zewnętrznej błony komórkowej [176,177]. Ponieważ jest to jedyna bariera oddzielająca komórkę od środowiska zewnętrznego, utrzymanie jej prawidłowego funkcjonowania jest kwestią krytyczną dla bakterii, a zmiany zachodzące w płynności membrany, wywołują nie tylko modyfikacje błonowych kwasów tłuszczowych [148], ale również indukują ekspresję genów szlaku odpowiedzi komórkowej σ^E [173]. Szlak ten został opisany jako jedna z odpowiedzi komórek bakterii *Escherichia coli* na stres wywołany szokiem temperaturowym [176], a jego aktywność została później potwierdzona również m. in. w komórkach *Salmonella typhimurium* eksponowanych na stres oksydacyjny [178], czy u bakterii *Pseudomonas putida* KT2440 eksponowanych na toluen [175]. Aktywacja odpowiedzi komórkowej następuje w wyniku reakcji komórki na spadek poziomu białka RseA,

związanego z monitorowaniem stanu sfałdowania białek błonowych (reakcja komórki na akumulację niesfałdowanych białek błonowych) lub wzrost ilości LPS, rozbijających kompleks RseA/RseB [173]. Należy zauważyć, że zmiany aktywności białek zewnętrznej membrany komórkowej (ang. *outer membranę proteins*, Omp) wykryto w komórkach badanych w niniejszej pracy szczepów eksponowanych zarówno na krótkotrwały, jak i długotrwały stres. Warto również podkreślić, że podjednostki sigma, do których zaliczana jest również σ^E wchodzą w skład bakteryjnej polimerazy RNA, odpowiedzialnej za specyficzną inicjację i kontrolę syntezy RNA w komórkach bakteryjnych [179]. Podjednostka σ^E wchodzi w skład kompleksu kontrolującego ekspresję genów kodujących białka katalizujące fałdowanie protein, ekspresję proteaz czy enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę lipidu A (wchodzącego w skład lipopolisacharydów i LPS) [180].

Modyfikacjom na skutek ekspozycji na ksenobiotyki ulegają również związane z błoną komórkową i pasywnym transportem niektórych zanieczyszczeń węglowodorowych poryny błonowe. Najlepiej opisanymi w literaturze proteinami z tej rodziny są białka zewnętrznej błony komórkowej ToX (*P. putida*) i TbuX (*Ralstonia pickettii*), XylN (*P. putida*) oraz TmoX (*Pseudomonas mendocina*), których udział w transporcie węglowodorów aromatycznych przez błonę komórkową został wykazany w licznych pracach naukowych [41,181–185]. Również w testowanych w niniejszej pracy mikroorganizmach zaobserwowano intensywny wzrost aktywności białek budujących poryny membranowe w komórkach poddanych zarówno długotrwałej, jak i krótkotrwałej ekspozycji na węglowodory. Ponadto, we wszystkich badanych układach aktywność tych białek zmniejszała się po przeniesieniu komórek na podłoże z dodatkiem glukozy. Może to świadczyć o znaczącym udziale tych białek w transporcie badanych węglowodorów aromatycznych do wnętrza komórek bakterii.

Kolejną grupą protein ulegających modyfikacji pod wpływem działania czynników stresowych są enzymy związane z wytwarzaniem energii w komórce (np. syntaza ATP) lub których działalność jest bezpośrednio skorelowana z ilością dostępnego ATP (np. ATP-zależna Clp proteaza – biorąca udział w usuwaniu nieprawidłowo sfałdowanych białek) [186]. Bakterie gram-ujemne wykorzystują ATP do transportu aktywnego zanieczyszczeń o dużej masie cząsteczkowej, przez kompleks membranowy TonB-ExbB-ExbD, wykorzystywany najczęściej do pobierania ze środowiska alkanów [187]. Modyfikacja aktywności białek związanych z syntezą ATP, świadczyć może o zmianie

zapotrzebowania komórek na energię potrzebną we wszystkich procesach komórkowych [188]. Wei i in. [189] zaobserwowali podwyższenie aktywności syntazy ATP oraz helikazy RNA zależnej od ATP w komórkach *Brevibacillus brevis* eksponowanych na piren. Enzymy te mogą pełnić istotną funkcję podczas transportu związków hydrofobowych do komórek, o czym może świadczyć wzrost efektywności biodegradacji pirenu w czasie. Zaobserwowali oni także równoczesny wzrost ilości błonowych kwasów nienasyconych, powodujący zmiany płynności tej struktuy komórkowej. Z drugiej strony, Efremenko i in. [190] odnotowali spadek ilości ATP w komórkach *Rhodococcus ruber* i *Pseudomonas putida* wraz ze wzrostem stężenia zanieczyszczeń węglowodorowych.

Analizowane zmiany profili białkowych bakterii eksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe są związane z indukcją ekspresji specyficznych białek, których aktywność jest znacznie niższa w komórkach nie poddawanych działaniu czynnika stresowego. Jak zauważyli Ramos i in. [191], bakterie szczepu *P. putida* w obecności węglowodorów aromatycznych aktywują złożony mechanizm odpowiedzi komórkowej, obejmujący uszczelnienie błony komórkowej, indukcję białek odpowiedzi na stres oraz podwyższoną produkcję energii. Badania zmian genomu i proteomu różnych mikroorganizmów wykazały zmiany ekspresji genów kodujących białka związane z metabolizmem kwasów tłuszczowych, mobilnością bakterii, odpowiedzią na stres cieplny (komórki *C. acetobutylicum* 824 w obecności rozpuszczalników organicznych [192]), antyoksydacją i detoksyfikacją (komórki *E. coli* i *C. acetobutylicum* podczas ekspozycji na butanol [193]), odpowiedzią na stres oksydacyjny oraz transportem i biosyntezą metabolitów (komórki *E. coli* eksponowane na butanol i izobutanol [194]).

Molina-Santiago i in. [195] wykazali, że szczep *P. putida* DOT-T1E (o zwiększonej odporności na ekspozycję na toluen) posiada tylko 30% genów zgodnych z podstawowym genomem rodzaju *Pseudomonas* (ang. *core – genome*). Odpowiedź na poziomie genetycznym komórek szczepów *P. putida* DOT-T1E (odpornego na toluen) oraz *P. putida* KT2440 (wrażliwego na toluen) była badana po poddaniu ich długotrwałej (kilka godzin, do osiągnięcia przez komórki późnej fazy ekspotencjalnej) lub krótkotrwałej ekspozycji (jedna godzina). Zaobserwowali oni, że w komórkach szczepu wrażliwego na toluen modyfikacji pod wpływem ekspozycji na badany rozpuszczalnik organiczny ulegała ekspresja innych białek niż w przypadku szczepu charakteryzującego się wysoką odpornością na badany

związek. Zmiany zachodzące w komórkach *P. putida* KT2440 były najbardziej widoczne w przypadku genów związanych z prawidłowym funkcjonowaniem błony komórkowej (ekspresja genów białek błonowych, kompleksów łańcuchów oddechowych, transporterów oraz kwasów tłuszczowych i lipidów), dążąc do zmniejszenia płynności błony komórkowej i zabezpieczenia bakterii przez niekorzystnym działaniem toluenu. Natomiast komórki szczepu *P. putida* DOT-T1E wykazywały nadekspresję genów związanych z metabolizmem wewnątrzkomórkowym, obejmujących hydrolazy, rybonukleazy, chaperony, proteinazy i geny związane z syntezą rybosomów [195]. Podobną charakterystykę zmian, związanych z aktywnością białek kodowanych przez geny odpowiadające za poszczególne funkcje metaboliczne, zaobserwowano w komórkach szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 oraz *A. calcoaceticus* M1B, analizowanych w niniejszej pracy. Badane szczepy charakteryzowały się również większym nasileniem zmian ekspresji białek związanych z funkcjonowaniem błony komórkowej w wyniku krótkotrwałej ekspozycji na węglowodory aromatyczne. Modyfikacje proteomu obserwowane w komórkach poddanych długotrwałej ekspozycji na zanieczyszczenia nie były tak znaczące, jednak wyniki hierarchicznego klasteringu białek sugerują, że skutkowały one znaczącymi zmianami funkcjonowania całego proteomu szczepów hodowlanych na pożywce z dodatkiem węglowodorów aromatycznych przez 12 miesięcy.

4. Porównanie zmian właściwości biodegradacyjnych komórek eksponowanych i nieeksponowanych na węglowodory

Ważnym elementem pracy była analiza porównawcza zdolności biodegradacyjnych wybranych zanieczyszczeń węglowodorowych przez komórki eksponowane przez 12 miesięcy na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy oraz komórki nieeksponowane. W tym celu przeprowadzono szereg prób biodegradacyjnych z udziałem wybranych szczepów w układach zawierających różne substraty węglowodorowe: mieszaninę węglowodorów aromatycznych lub alifatycznych oraz olej napędowy. Porównano zarówno zdolności degradacyjne komórek eksponowanych na węglowodory, jak i nieeksponowanych na badane związki. Oceniono również wpływ ekspozycji komórki na wybraną grupę węglowodorów (aromatycznych, alifatycznych lub olej napędowy)

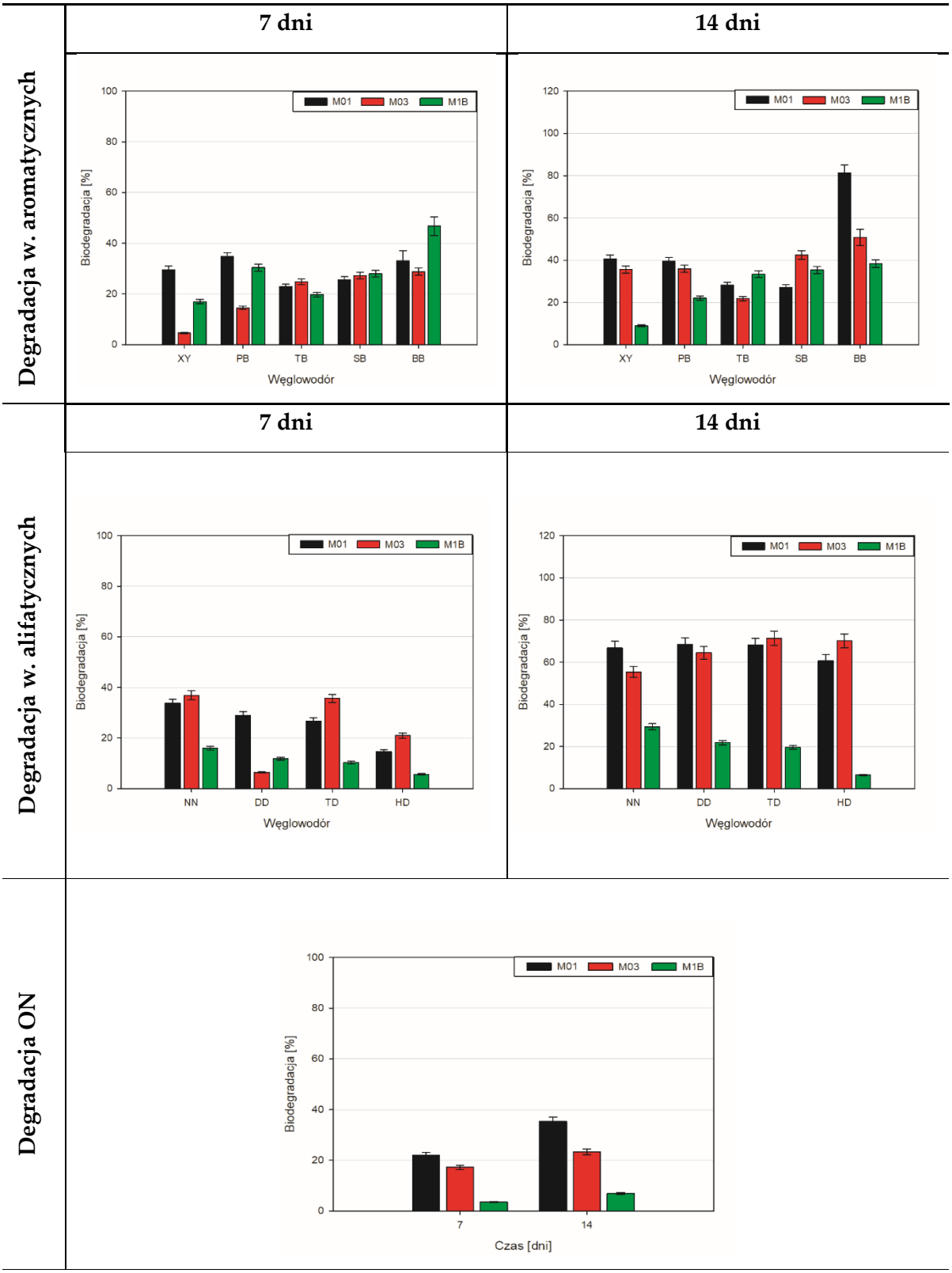
w metabolizowaniu innych grup zanieczyszczeń. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zostały przedstawione w kolejnych podrozdziałach.

4.1. Biodegradacja węglowodórów przez bakterie nieeksponowane

Jako próbę odniesienia w dalszych analizach wykorzystano wyniki biodegradacji poszczególnych węglowodorów przez mikroorganizmy nieeksponowane, czyli utrzymywane na agarze wzbogaconym i namnażane przed pomiarami w hodowlach płynnych z dodatkiem glukozy jako źródła węgla i energii. Na Rysunku III. 16 przedstawiono wyniki testów biodegradacyjnych prowadzonych dla bakterii nieeksponowanych w układach zawierających jako biodegradowany substrat odpowiednio: węglowodory aromatyczne, węglowodory alifatyczne lub olej napędowy.

Przedstawione na wykresach dane potwierdzają, że wszystkie badane szczepy wyizolowane z próbek środowiskowych posiadały zdolność do metabolizowania testowanych węglowodorów, jednak efektywność prowadzonych przez nie procesów biodegradacji zależała od szczepu oraz dostępnego substratu węglowodorowego. Wyniki przeprowadzonych badań mikrobiologicznego rozkładu węglowodorów aromatycznych pozwalają stwierdzić, że szczep *R. planticola* M01 charakteryzował się średenią efektywnością biodegradacji badanych węglowodorów aromatycznych na poziomie około 30% po 7 dniach prowadzenia eksperymentu.

Wartym odnotowania jest znaczny wzrost efektywności usuwania butylobenzenu przez ten szczep po 14 dniach prowadzenia procesu, z 33% do 81%. Zaobserwowano również nieznaczną, w stosunku do wyników uzyskanych po 7 dniach, poprawę usuwania *tert*-butylobenzenu (z 23% do 28%) oraz sec-butylobenzenu (z 25% do 27%). Procesy degradacji węglowodorów alifatycznych prowadzone przez nieeksponowany na węglowoodry szczep *R. planticola* M01 charakteryzowały się środnią biodegradacją na poziomie ok 20% po 7 dniach. Warto równiez zwrócić uwagę, że węglowodory o dłuższych łańcuchach alifatycznych były gorzej degradowane (biodegradacja nonanu wynosiła 34%, a heksadekanu 15% po 7 dniach). Jednak po 14 dniach prowadzenia procesu biodegradacji węglowodorów alifatycznych różnice w usuwaniu poszczególnych związków alifatycznych nie przekraczały 8%.



Rysunek III. 16. Biodegradacja węglowodorów aromatycznych, alifatycznych lub oleju napędowego przez badane szczepy po 7 oraz 14 dniach. Litery na wykresach oznaczają poszczególne węglowodory: ksylen (XY), propylobenzen (PB), *tert*-butylobenzen (TB), *sec*-butylobenzen (SB), butylobenzen (BB), nonan (NN), dodekan (DD), tridekan (TD), heksadekan (HD)

W przypadku szczepu *R. ornithinolytica* M03 wydłużenie procesu biodegradacji do 14 dni spowodowało wzrost mikrobiologicznego rozkładu dla ksylenu, propylobenzenu, *sec*-butylobenzenu oraz butylobenzenu. Największy wzrost biodegradacji zaobserwowano dla ksylenu (z 4% do 36% po 14 dniach) oraz propylobenzenu (z 14% do 36% po 14 dniach). W układach z dodatkiem węglowodrów alifatycznych, najgorzej degradaowany po 7 dniach przez ten szczep był dodekan, który został zmetabolizowany jedynie w 6%. Podobnie jak w przypadku degradacji węglowodorów aromatycznych, nieeksponowany szczep *R. ornithinolytica* M03 charakteryzował się znaczącym wzrostem biodegradacji analizowanych węglowodrów alifatycznych po wydłużeniu procesu degradacji do 14 dni, metabolizując 55% nonanu, 64% dodekanu, 71% tridekanu oraz 70% heksadekanu .

Bakterie *A. calcoaceticus* M1B odznaczały się około 30% zdolnością biodegradacji węglowodrów aromatycznych w ciągu 7 dni, a wydłużenie procesu degradacji do 14 dni nie wpłynęło znacząco na efektyność procesu. Ponadto, w przypadku komórek szczepu *A. calcoaceticus* M1B odnotowano najniższą efektywność biodegradacji nonanu (29%), dodekanu (22%), tridekanu (19%) i heksadekanu (6%) po 14 dniach prowadzenia hodowli. Uzyskane wyniki były 2-4 razy gorsze niż wartości biodegradacji uzyskane w tym samym czasie przez pozostałe dwa szczepy, degradujące te same związki. Warto również zwrócić uwagę na spadek efektywności biodegradacji węglowodorów alifatycznych przez bakterie *A. calcoaceticus* M1B wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego.

Również eksperymenty mające na celu określenie zdolności biodegradacyjnych badanych szczepów w stosunku do oleju napędowego jako źródła węgla w hodowli ujawniły bardzo małe zdolności szczepu *A. calcoaceticus* M1B do rozkładu węglowodów wchodzących w skład oleju napedowego (biodegradacja 7% po 14 dniach). Z kolei bakterie *R. planticola* M01 oraz *R. ornithinolytica* M03 wykazywały większą efektywność prowadzonych procesów degradacyjnych wynoszącą odpowiednio 35% i 23%. Jednak żaden z badanych szczepów nie był zdolny do usunięcia 40% oleju napędowego po 14 dniach prowadzenia procesu.

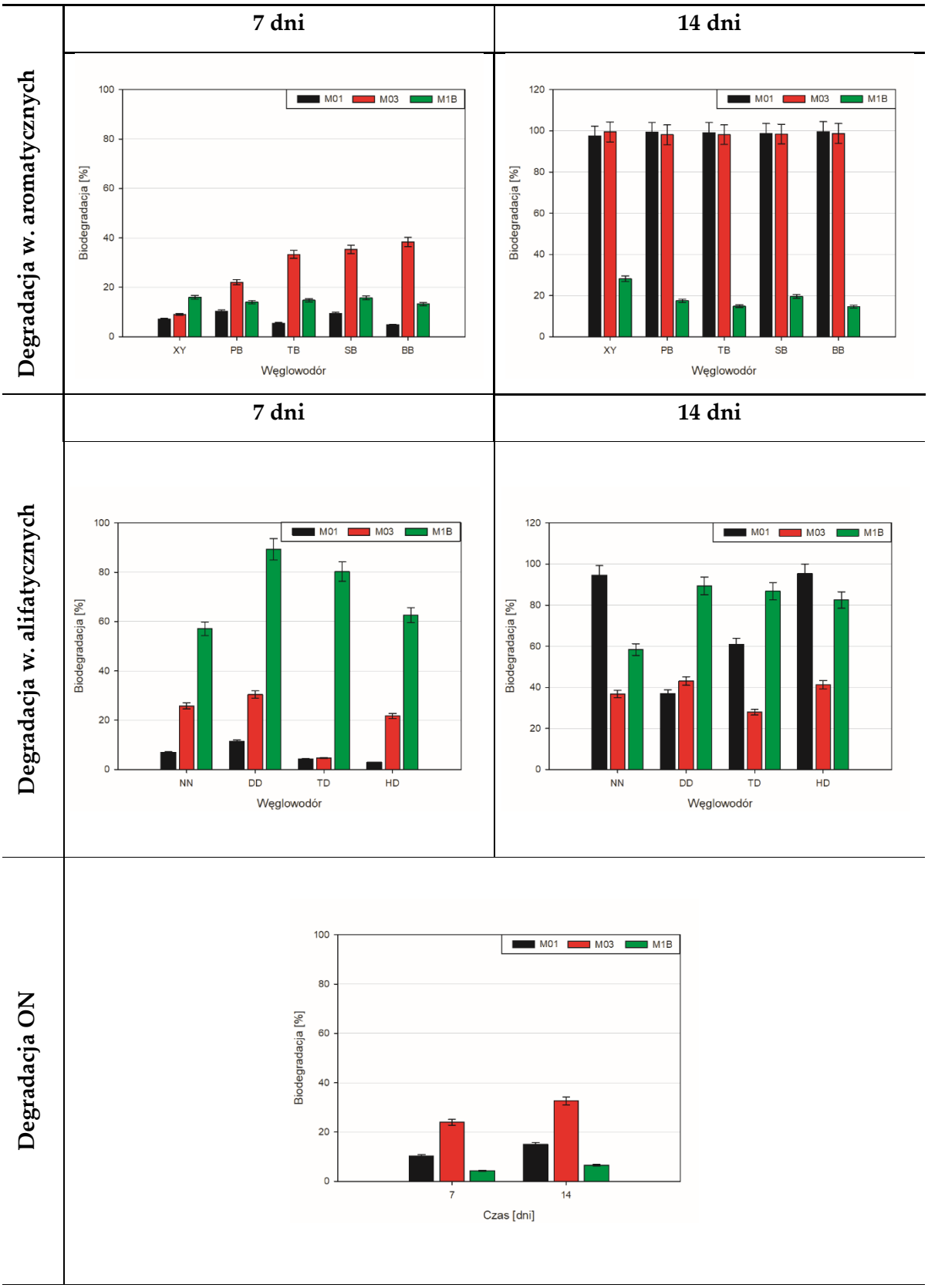
4.2. Biodegradacja węglowodorów przez bakterie eksponowane na węglowodory aromatyczne

Jak wykazano w poprzednich rozdziałach niniejszej pracy, ekspozycja komórek szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B na węglowodory wywołała modyfikacje ich właściwości powierzchniowych, strukturalnych i metabolicznych,

a przedstawione na Rysunku III.17 wyniki świadczą o znaczącym, korzystnym wpływie tych zmian na właściwości biodegradacyjne badanych szczepów.

Wartości biodegradacji testowanych węglowodorów aromatycznych po 7 dniach nie przekraczały 20% dla szczepów *R. planticola* M01 i *A. calcoaceticus* M1B oraz 40% dla bakterii *R. ornithinolytica* M03. Warto jednak zauważyć, że po kolejnych 7 dniach prowadzenia procesu odnotowano znaczący, przekraczający 90% wzrost efektywności usuwania ksylenu, propylobenzenu, *tert*-butylobenzenu, *sec*-butylobenzenu i butylobenzenu w przypadku mikroorganizmów *R. planticola* M01 i *R. ornithinolytica* M03. Tego typu pozytywnego efektu nie odnotowano dla szczepu *A. calcoaceticus* M1B, dla którego biodegradacja węglowodorów aromatycznych po 14 dniach prowadzenia procesu nie uległa istotnym zmianom w stosunku do wyników uzyskanych po 7 dniach. Należy jednak podkreślić, że bakterie tego szczepu poddane ekspozycji na węglowodory aromatyczne znacznie lepiej radziły sobie z degradacją węglowodorów alifatycznych, osiągając wydajność 89% usuwania dodekanu po 7 dniach. Zaobserwowano również poprawę efektywności mikrobiologicznego usuwania zanieczyszczeń alifatycznych przez szczep *A. calcoaceticus* M1B po 14 dniach prowadzenia procesu skutkujący degradacją 58% nonanu, 89% dodekanu, 87% tridekanu oraz 82% heksadekanu.

Znaczący wzrost biodegradacji węglowodórw alifatycznych obserwowany był również w przypadku szczepu *R. planticola* M01 poddanego ekspozycji na węglowodory aromatyczne (z 7% do 94% nonanu oraz z 3% do 95% heksadekanu po 14 dniach). Najgorzej rozkładanym przez ten szczep po 14 dniach związkiem był dodekan, którego degradacja wyniosła 37%. Szczep *R. ornithinolytica* M03 poddany 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne posiadał najnizszą sposród badanych szczpeów zdolnosć do usuwani związków alifatycznych, która nie przekraczała średnio 40% po 14 dniach prowadzenia procesu (Rysunek III. 17).



Rysunek III. 17. Biodegradacja węglowodorów aromatycznych, alifatycznych lub oleju napędowego przez badane szczepy eksponowane na węglowoodry aromatyczne po 7 oraz 14 dniach. Litery na wykresach oznaczają poszczególne węglowodory: ksylen (XY), propylobenzen (PB), tert-butylobenzen (TB), sec-butylobenzen (SB), butylobenzen (BB), nonan (NN), dodekan (DD), tridekan (TD), heksadekan (HD)

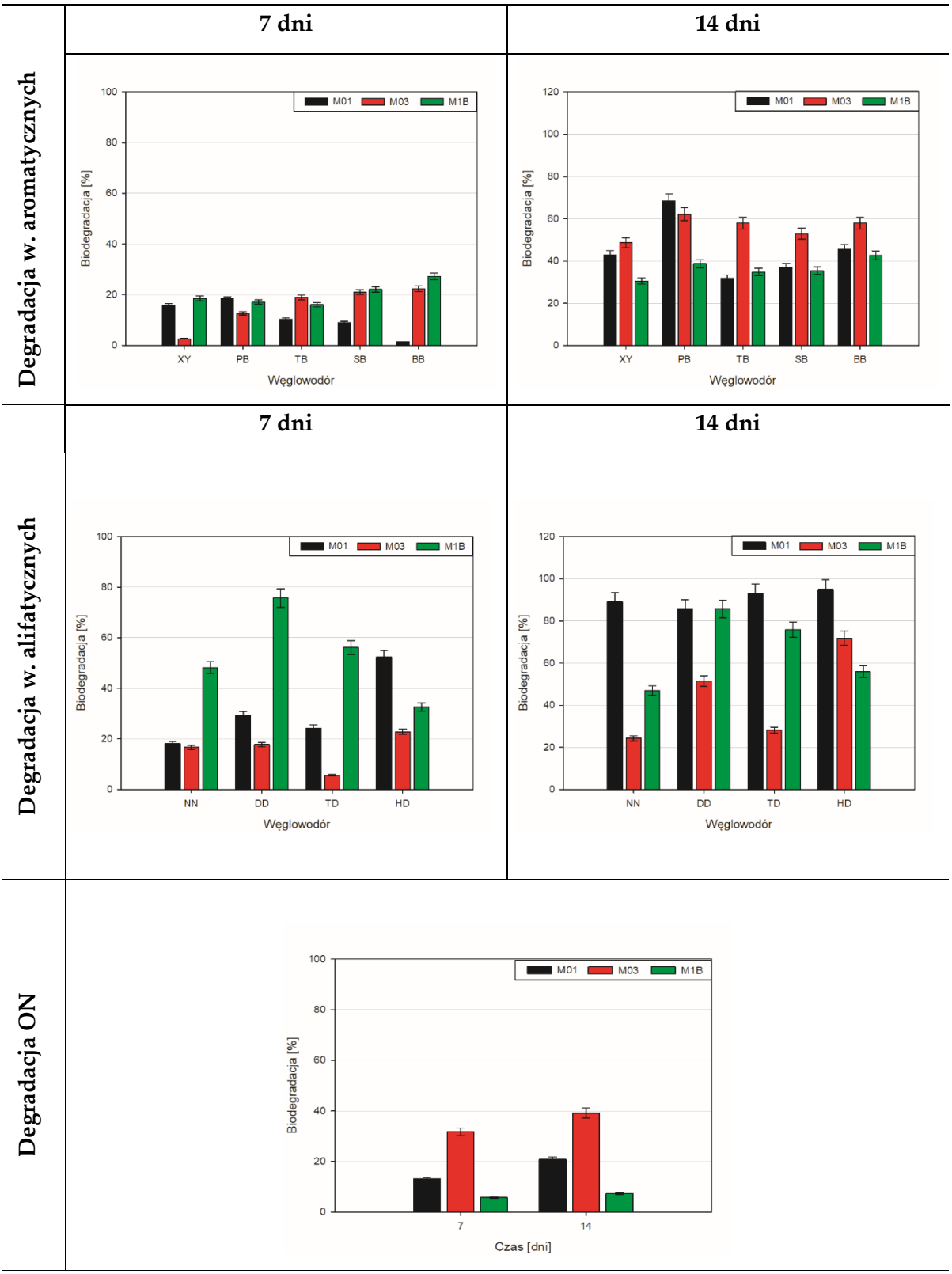
Komóreki badanych szczepów po 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne posiadały zróżnicowaną zdolność do biodegradacji węglowodórw wchodzących w skład oleju napędowego. Szczepy *R. planticola* M01 i *A. calcoaceticus* M1B zdegradowały odpowiednio 15% oraz 7% oleju napędowego po 14 dniach i były to wartości niższe niż wyniki uzyskane dla nieeksponowanych komórek tych szczepów. Jednak eksponowane na węglowodory aromatyczne mikroorganizmy szczepu *R. ornithinolytica* M03 zwiększyły biodegradację oleju napędowego (z 23% do 33%) w stosunku do nieeksponowanych komórek tego samego szczepu.

4.3. **Biodegradacja węglowodorów przez bakterie eksponowane na węglowodory alifatyczne**

Komórki badanych szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 oraz *A. calcoaceticus* M1B poddano również 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory alifatyczne, a wpływ tej ekspozycji na ich zdolności do usuwania węglowodorów z różnych grup przebadano w odpowiednich próbach degradacyjnych (Rysunek III. 18).

Uzyskane wyniki pokazują, że komórki mikroorganizmów eksponowanych na węglowodory alifatyczne biodegradowały węglowodory aromatyczne po 7 dniach w mniejszym stopniu niż bakterie nie poddane ekspozycji. Jednak wydłużenie procesu degradacji do 14 dni spowodowało około dwukrotny wzrost efektywności rozkładu związków aromatycznych przez te bakterie, a najefektywniej usuwanym węglowodorem był propylobenzen.

Największe różnice po 14 dniach procesu degradacji obserwowano w przypadku usuwani ksylenu przez bakterie *R. ornithinolytica* M03 eksponowane na związki alifatyczne (wzrost z 3% do 49%) oraz butylobenzenu przez bakterie *R. planticola* M01 eksponowane na związki alifatyczne (wzrost z 2% do 45%).



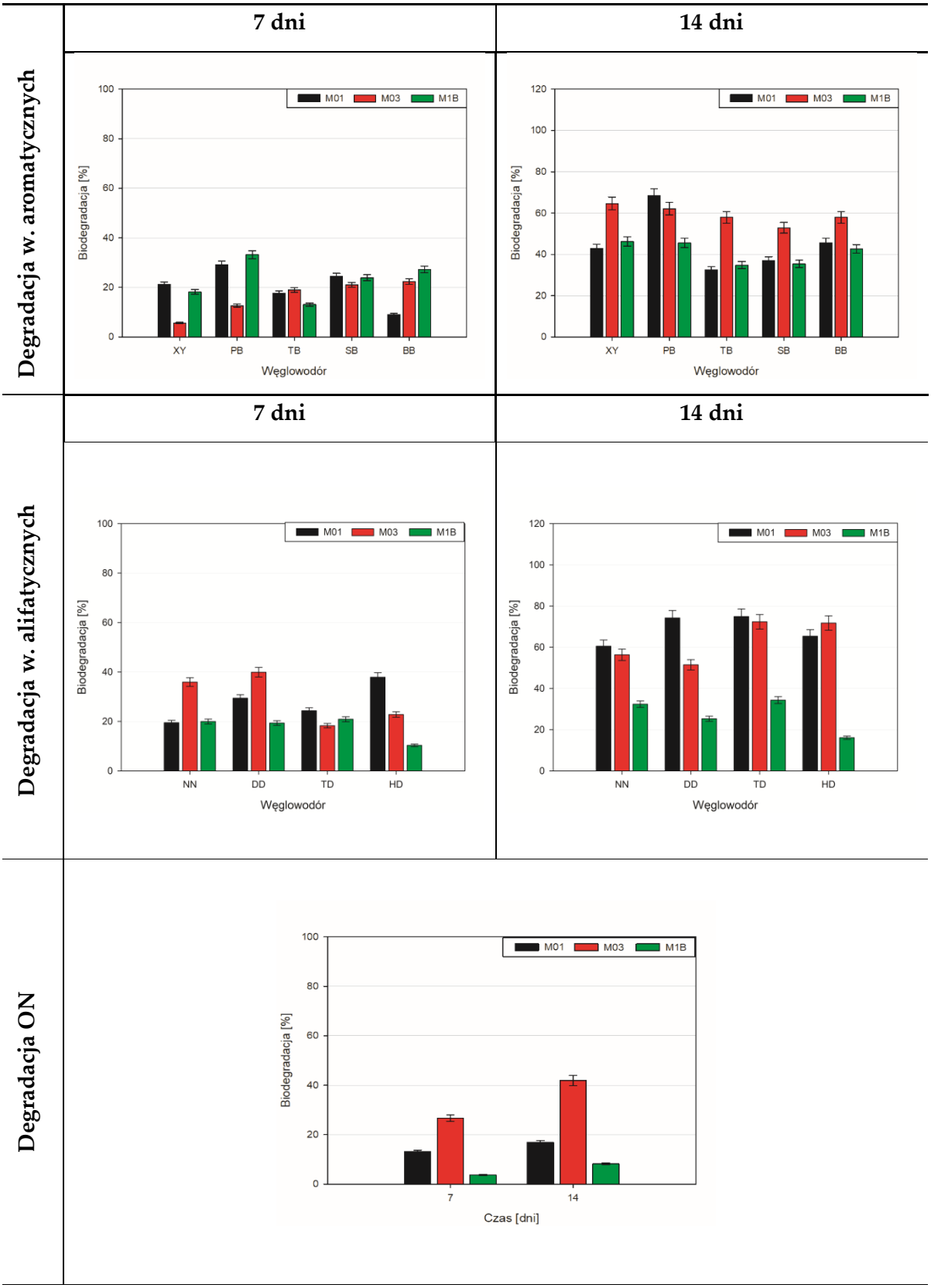
Rysunek III. 18. Biodegradacja węglowodorów aromatycznych, alifatycznych lub oleju napędowego przez badane szczepy eksponowane na węglowodory alifatyczne po 7 oraz 14 dniach. Litery na wykresach oznaczają poszczególne węglowodory: ksylen (XY), propylobenzen (PB), *tert*-butylobenzen (TB), *sec*-butylobenzen (SB), butylobenzen (BB), nonan (NN), dodekan (DD), tridekan (TD), heksadekan (HD)

Przeprowadzona ekspozycja komórek na związki alifatyczne skutkowała znaczącym wzrostem ich zdolności do usuwania węglowodorów alifatycznych *rysunek III. 18). Tak jak w przypadku komórek eksponowanych na związki aromatyczne, najlepsze rezultaty po 7 dniach uzyskano dla hodowli prowadzonych dla szczepu *A. calcoaceticus* M1B, który degradował 48% nonanu, 76% dodekanu, 56% tridekanu oraz 33% heksadekanu. Wyniki efektywności procesu biodegradacji badanych związków alifatycznych przez szczep *R. planticola* M01 po 14 dniach przekraczały 80% w przypadku usuwania nonanu i dodekanu oraz 90% dla tridekanu i heksadekanu. 12-miesięczna ekspozycja komórek *R. ornithinolytica* M03 na węglowodory nie poprawiła efektywności degradacji związków alifatycznych przez ten szczep, w porównaniu do bakterii nieeksponowanych. Jednak komórki tego szczepu eksponowane na węglowodory alifatyczne posiadały największą spośród badanych mikroorganizmów zdolność do degradacji oleju napędowego zarówno po 7, jak i 14 dniach, wynoszącą odpowiednio 32% i 39%.

4.4. Biodegradacja węglowodorów przez bakterie eksponowane na olej napędowy

Ostatnie z badanych układów biodegradacyjnych zawierały komórki poddane 12-miesięcznej ekspozycji na olej napędowy (Rysunek III.19).

Przedstawione na wykresach dane wskazują na poprawę efektywności usuwania badanych węglowodorów przez analizowane szczepy *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 oraz *A. calcoaceticus* M1B. Mikroorganizmy eksponowane na olej napędowy po 14 dniach prowadzenia procesu osiągały średnio około 50-60% efektywność usuwania związków aromatycznych. Najwieksze różnice w degradacji poszczególnych węglowodorów aromatycznych obserwowane były dla szczepu *R. planticola* M01, który usuwał 32% *tert*-butylobenzenu, 37% *sec*-butylobenzenu, 43% ksylenu, 46% butylobenzenu oraz 68% propylobenzenu.



Rysunek III. 19. Biodegradacja węglowodorów aromatycznych, alifatycznych lub oleju napędowego przez badane szczepy eksponowane na olej napędowy po 7 oraz 14 dniach. Litery na wykresach oznaczają poszczególne węglowodory: ksylen (XY), propylobenzen (PB), *tert*-butylobenzen (TB), *sec*-butylobenzen (SB), butylobenzen (BB), nonan (NN), dodekan (DD), tridekan (TD), heksadekan (HD)

Dla pozostałych badanych szczepów eksponowanych na olej napędowy różnice w biodegradacji poszczególnych składników analizowanej mieszaniy nie przekraczały 10%.

Wyniki przeprowadzonych pomiarów wskazują również na korzystny wpływ 12-miesięcznej ekspozycji na olej napędowy na biodegradację węglowodorów alifatycznych przez badane mikroorganizmy. W przypadku szczepu *R. ornithinolytica* M03 można zaobserwować, że w ciągu 7 dni procesu degradacji związków alifatycznych lepiej degradowane były węglowodory o długości łańcucha do 10 atomów wegla. Wydłużenie procesu degradacji do 14 dni zaowocowało znaczącym wzrostem biodegradacji tridekanu i heksadekanu, odpowiednio z 18% do 72% dla tridekanu oraz z 23% do 72% dla heksadekanu. Przekraczające 60% wartości biodegraqdacji związków alifatycznych odnotowano również dla komórek szczepu *R. planticola* M01 eksponowanych na olej napędowy, po 14 dniach degradacji.

Najistotniejsze zmiany zdolności degradacyjnych przez komórki eksponowane przez 12 miesięcy na olej napędowy można zaobserwować w próbach bioderadacynych z olejem napędowym. Eksponowane komórki szczepów *A. calcoaceticus* M1B i *R. ornithinolytica* M03 posiadały zdolność do degradacji odpowiednio 8% oraz 42% węglowodorów wchodzących w skład mieszaniny, podczas gdy komórki tych samych szczepów nie poddane ekspozycji były zdolne do rozkładu 7% i 23% oleju napędowego.

4.5. **Dyskusja wyników**

Usuwanie zanieczyszczeń węglowodorowych jest jednym z problemów współczesnej gospodarki, a znalezienie efektywnego rozwiązania tej kwestii pozwoli na poprawę warunków życia oraz jakości środowiska, w którym żyjemy. Metody biologiczne, będące interesującą alternatywą dla fizyko-chemicznych technik usuwania zanieczyszczeń są intensywnie badane ze względu na stosunkowo niski koszt ich implementacji, a także niewielki wpływ na środowisko. Jednym z ograniczeń występujących jednak przy zastosowaniu bioremiediacji jest ograniczona biodostępność ksenobiotyków dla mikroorganizmów. Podjęte w niniejszej pracy badania nad wpływem długotrwałego kontaktu mikroorganizmów z zanieczyszczeniami na ich zdolności degradacyjne pozwoliły zauważyć znaczące zmiany właściwości bakterii w kierunku zwiększenia biodostępności zanieczyszczeń. Jak wykazały przeprowadzone analizy zdolności biodegradacyjnych

mikroorganizmów eksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe, posiadają one wyższy potencjał degradacyjny niż komórki z próby kontrolnej.

Zdolność mikroorganizmów do rozkładu węglowodorów z różnych grup została potwierdzona przez wielu badaczy [27], należy jednak podkreślić fundamentalną rolę ekspozycji mikroorganizmów na zanieczyszczenia, na ich zdolności degradacyjne. Dane literaturowe wskazują, że największą efektywnością usuwania różnego rodzaju zanieczyszczeń węglowodorowych posiadają mikroorganizmy, które miały wcześniej kontakt ze związkami podobnymi do degradowanych: Song i in. [196] zaobserwowali ok. 90% degradację kerozyny po 120 dniach przez bakterie wyizolowane z gleby zanieczyszczonej węglowodorami, Mishra i in. [146] odnotowali usunięcie ponad 90% heskadekanu po 10 dniach przez komórki szczepów *Pseudomonas aeruginosa* PSA5, *Rhodococcus* sp. NJ2 i *Ochrobactrum intermedium* P2 wyizolowane z osadu czynnego oczyszczalni przy rafinerii, a Hernandez i Torre [95] stwierdzili, że długotrwałą ekspozycja bakterii na olej silikonowy (SO200) oraz 2, 2, 4, 4, 6, 8, 8-heptametylononan (HMN) skutkuje nawet 3-krotnym wzrostem efektywności degradacji heksanu. Wyniki uzyskane przez innych badaczy znajdują również potwierdzenie w rezultatach testów biodegradacji przeprowadzonych w niniejszej pracy, gdzie zaobserwowano około 50% wzrost zdolności degradacji węglowodorów alifatycznych przez bakterie szczepu *R. planticola* M01 oraz ponad 3-krotny wzrost efektywności usuwania tych związków przez komórki szczepu *A. calcoacticus* M1B, w porównaniu do wyników uzyskiwanych przez szczepy z próby kontrolnej (bakterie nieeksponowane). Ponadto, obserwowany na początku prowadzenia procesu biodegradacji spadek efektywności usuwania zanieczyszczeń przez komórki eksponowane, w porównaniu do komórek nieeksponowanych może być spowodowany przejściowym wprowadzeniem komórek w stan VBNC na skutek wprowadzenia bakterii do nowego środowiska [197].

Również w przypadku degradacji węglowodorów aromatycznych znaczącą efektywnością usuwania tego typu związków charakteryzują się szczepy bakteryjne izolowane z środowisk zanieczyszczonych węglowodorami ropopochodnymi. W literaturze odnotowywane są przypadki całkowitego usuwania węglowodorów wchodzących w skład mieszaniny BTEX (benzen, etylobenzen, toluen, ksylen) w układach kometabolicznych [198]. Odnaleźć można również przykłady degradacji prawie 80% węglowodorowej frakcji aromatycznej z oleju napędowego [199], czy bioremiediacji aliklopodstawionych

węglowodorów aromatycznych przez szczep *P. stutzeri* 9 eksponowany wcześniej na olej napędowy [98]. Zhang i in. [200] zaobserwowali również ponad 90% efektywność usuwania węglowodorów z mieszaniny BTEX przez komórki *Mycobacterium cosmeticum* byf-4, wyizolowane z osadu czynnego oczyszczalni przy rafinerii. Podobną zależność można zauważyć u mikroorganizmów testowanych w niniejszej pracy doktorskiej. Zaobserwowany wysoki wzrost efektywności degradacji węglowodorów aromatycznych przez mikroorganizmy szczepów *R. planticola* M01 oraz *R. ornithinolytica* M03 (ponad 90% efektywność po 14 w porównaniu do średnio ok. 40% efektywności osiąganej przez szczep nieeksponowany) świadczy o zwiększeniu biodostępności tych substratów dla komórek oraz ich efektywnym metabolizowaniu. Należy również zauważyć, że pozytywny wpływ ekspozycji na węglowodory aromatyczne na zdolność do ich degradacji przez komórki zaobserwowali również Mamma i in. [201] w przypadku komórek *P. putida* „aklimatyzowanych" w hodowli z fenolem, czy szczepu *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9 hodowanego wcześniej na podłożu z fenantrenem, pirenem i benzo-a-pirenem analizowanego przez Subashchandrabose i in. [202]. Wyniki te wskazują, że u bakterii, które posiadają zdolność rozkładu wybranych zanieczyszczeń można indukować zmiany strukturalne i metaboliczne pozwalające im osiągać wysoką efektywność biodegradacji związków.

5. Ocena możliwości wykorzystania uzyskanych szczepów w usuwaniu zanieczyszczeń węglowodorowych z próbek wodnych

5.1. Biodegradacja oleju napędowego

Potencjał aplikacyjny mikroorganizmów o właściwościach zmodyfikowanych w wyniku długotrwałej ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe został przebadany poprzez przeprowadzenie prób biodegradacyjnych z wykorzystaniem wody jeziornej pobranej z dwóch różnych zbiorników słodkowodnych: jeziora przy Rezerwaci Wydrowe Łęgi zlokalizowanego w Drawieńskim Parku Narodowym (W1) oraz z Jeziora Kierskiego (W2). Wyniki charakterystyki bichemicznej i mikrobiologicznej pobranych próbek wody wskazują, na większą zawartość suchej masyw zbiorniku W1, co sugeruje bodatszy skład mineralny niż w przypadku zbiornika W2. Porównując zawartość suchej masy organizcznej należy zauważyć, że zbiornik W2 charakteryzował się wyższą zawartością tego składnika, co

może wskazywać na większą ilość substancji organicznych znajdujących się w tym jeziorze. Pomiary pH obu próbek nie wykazały znaczących różnic wartości analizowanego parametru (Tabela III. 8).

Tabela III. 8. Oznaczenie, lokalizacja miejsca poboru próbek oraz parametry charakteryzujące wykorzystane w badaniach próbki wody jeziornej

Woda	SM [%]	SMO [%]	pH	Rozcieńczenie 1:100	
				Liczba mikroorganizmów na płytce [-]	**Miano hodowli (N) [1/ml]**
W1	0,346 ± 0,03	0,00087 ± 0,00	7,89	40 ± 2	0,4 ± 0,03
W2	0,319 ± 0,04	0,00100 ± 0,00	7,88	33 ± 1	0,33 ± 0,01

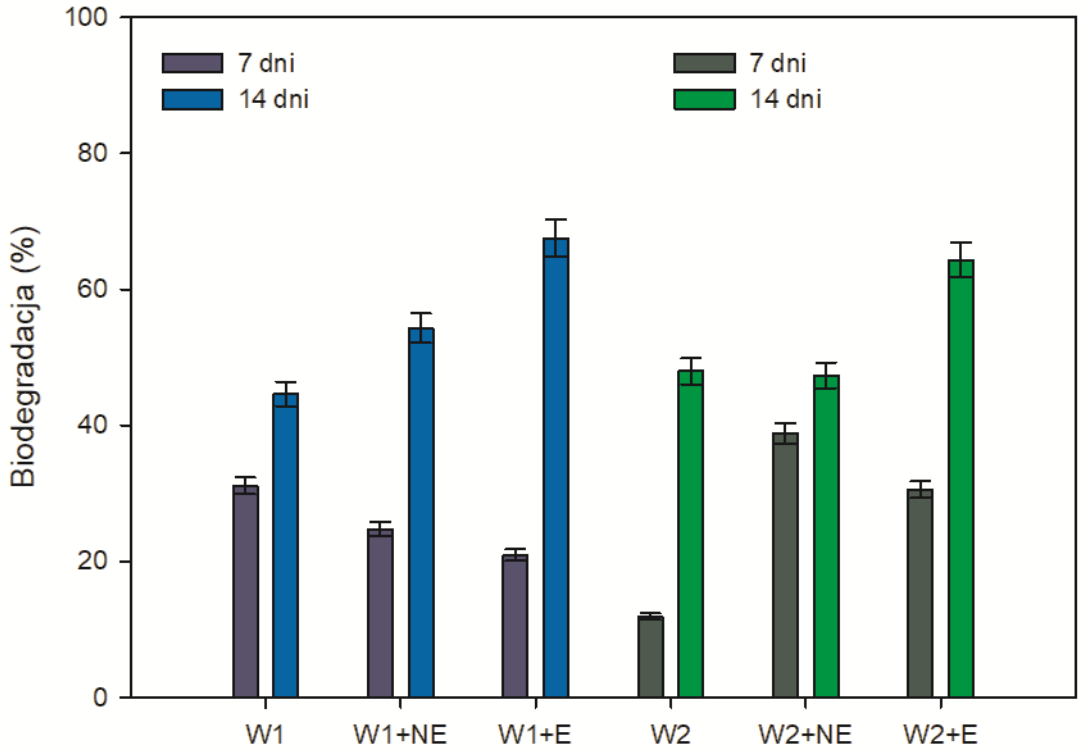
SM – sucha masa; SMO – sucha masa organiczna

Obliczone miana hodowli bakteryjnych wskazują, że ilość mikroorganizmów w 1 ml pobranej wody była zbliżona, a obliczone miano hodowlin wynosiło 0,4 oraz 0,33 odpowiednio dla próbek ze zbiorników W1 i W2.

Hodowle biodegradacyjne prowadzono w oparciu o wodę ze zbiornika W1 lub W2, zawierające naturalne konsorcjum mikroorganizmów. Próbki wzbogacono poprzez bioaugmentację, wprowadzając po jednym z dwóch rodzajów konsorcjum bakteryjnego:

- konsorcjum złożone z trzech badanych szczepów nieeksponowanych na węglowodory
- konsorcjum złożone z trzech badanych szczepów eksponowanych na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy.

Następnie dodano do nich olej napędowy jako jedyne źródło węgla i energii w układzie. Próby biodegradacyjne prowadzono przez 7 i 14 dni, a pozostałości niezdegradowanych składników oleju napędowego ekstrachowano heksanem i analizowano z wykorzystaniem chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowano na Rysunku III. 20.



Rysunek III. 20. Wyniki pomiarów ilościowych niezdegradowanej frakcji oleju napędowego w próbach biodegradacyjnych prowadzonych przez 7 lub 14 dni w układach zawierających: wodę jeziorną 1 (W1) lub wodę jeziorną 2 (W2), wodę bioaugmentowaną szczepami nieeksponowanymi (+NE) lub szczepami eksponowanymi na wybrane węglowodory aromatyczne alifatyczne i olej napędowy (+E)

Analizy wpływu bioaugmentacji wody jeziornej pobranej z dwóch różnych zbiorników (W1 lub W2) z wykorzystaniem konsorcjum mikroorganizmów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B poddanych 12-miesięcznej ekspozycji na wybrane węglowodory (+E) lub hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy (+NE) pozwoliły ocenić wpływ procesu bioaugmnentacji na zdolności degradacyjne konsorcjum ze zbiorników słodkowodnych. Przedstawione wyniki dowodzą, że bioaugmentacja może być skuteczną metodą wspomagającą biodegradację zanieczyszczeń ropopochodnych w naturalnych zbiornikach słodkowodnych.

Należy podkreślić, że zarówno układy bioaugmentowane bakteriami eksponowanymi na zanieczyszczenia, jak i nieeksponowanymi, charakteryzowały się większą zdolnością do degradacji składników oleju napędowego po 14 dniach prowadzenia procesu. Najmniejsze różnice w efektywności usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych występują pomiędzy układami zawierającymi samą wodę jeziorną 2 (W2) oraz wodę bioaugmentowaną bakteriami

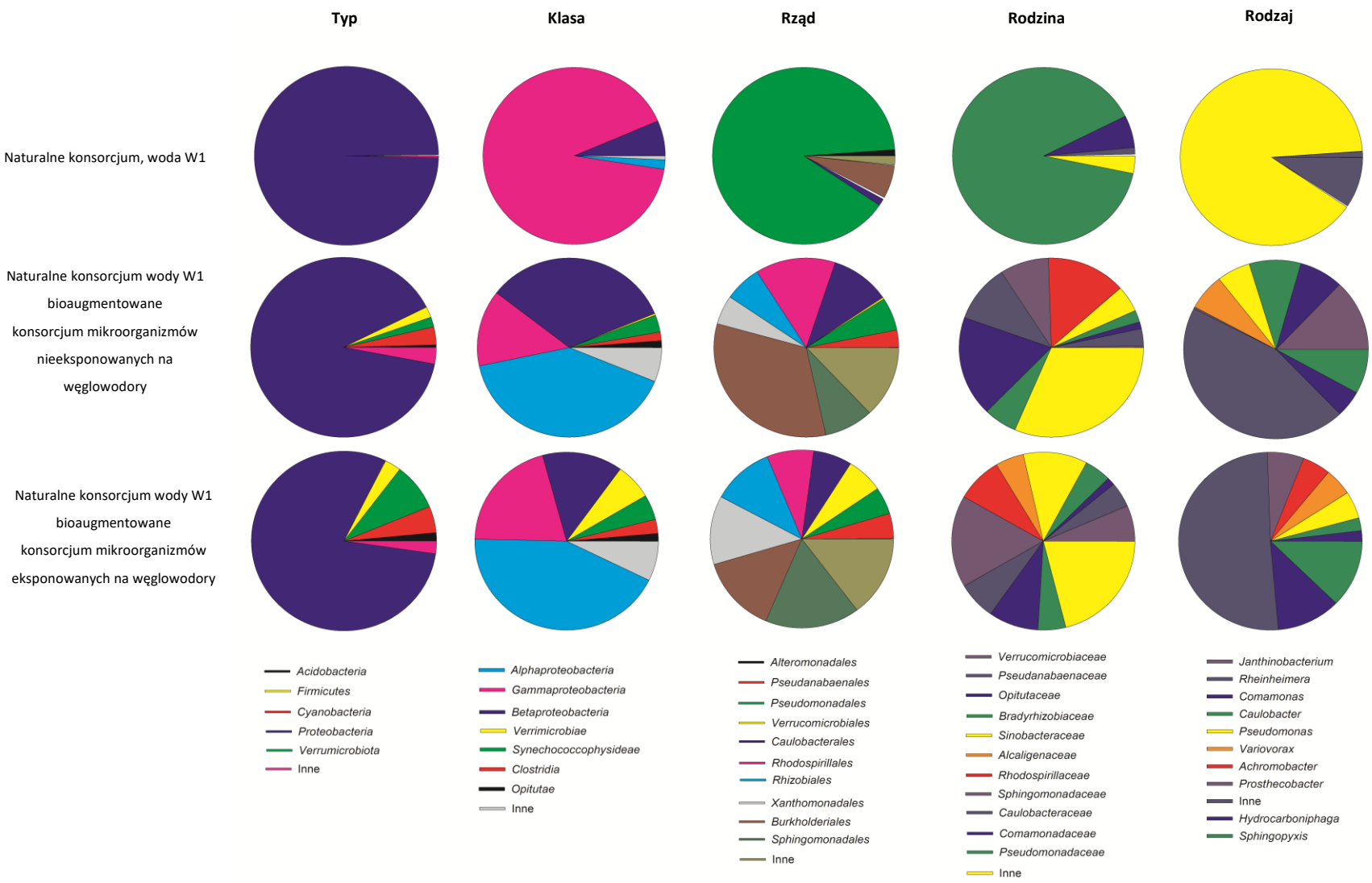
z próby kontrolnej (W2+NE), w których bioodegradacja wynosiła odpowiednio 46% oraz 47%. Podobną wydajnością charakteryzował się również układ zawierający samą wodę jeziorną 1 (W1), gdzie biodegradacja oleju napędowego po 14 dniach wynosiła 44%. Spośród wszystkich badanych prób, niezależnie od miejsca pochodzenia wody jeziornej, największą efektywność usuwania składników oleju napędowego posiadały hodowle bioaugmentowane szczepami eksponowanymi na węglowodory aromatyczne i alifatyczne. Zarówno w przypadku układów tworzonych w oparciu o wodę jeziorną 1 (W1+E), jak i wodę jeziorną 2 (W2+E), hodowle wzbogacone dodatkiem szczepów eksponowanych wykazywały odpowiednio: 68% i 66% biodegradacji oleju napędowego po 14 dniach.

5.2. Analiza metagenomu

W celu oceny wpływu bioaugmentowanych mikroorganizmów na naturalną mikroflorę badanych układów wodnych, przeprowadzono analizy zmian puli genetycznej bakterii zamieszkujących badane habitaty. Wykorzystano do tego zaawansowane metody sekwencjonowania metagenomu próbek wodnych przed wprowadzeniem mikroorganizmów eksponowanych na węglowodory (E) lub nieeksponowanych (wzrastających na podłozu z glukozą – NE) oraz w wybranych odstępach czasu po bioaugmentacji.

Wyniki przedstawione na Rysunku III.21 wskazuj na dominujący udział bakterii w metagenomie ze wszystkich wyizolowanych próbek. Najmniejszą różnorodnością charakteryzowały się mikroorganizmy pobrane z próbek wody jeziornej W1 (po 1 dniu inkubacji z olejem napędowym), gdzie dominował typ *Proteobacteria,* klasa *Gammaproteobacteria* i mikroorganizmy z gatunku *Pseudomonas* (*Pseudomonas moraviensis* 57,11% oraz *Pseudomonas miguale* 20,68%) a pozostałe sklasyfikowane mikroorganizmy stanowiły łącznie 4,33%.

W wyniku bioaugmentacji próbek wody jeziornej mikroorganizmami nieeksponowanymi oraz eksponowanymi na węglowodory można zauważyć znaczący wzrost bioróżnorodności na wszystkich poziomach taksonomicznych. Należy również zwrócić uwagę, że różnorodność w wyziolowanych próbkach zmieniała się w czasie o czym świadczą badania przeprowadzane dla próbek pobieranych po 14 i 60 dniach prowadzenia procesu degradaji oleju napędowego przez układy zawierające wodę jeziorną i bioaugmentowane mikrooganizmy (Rysunki III. 21 oraz S1).



Rysunek III. 21. Względna liczebność mikroorganizmów określoanna podstawie analizy metgenomu próbek środowiskowych pobranych ze zbiornika słodkowodnego w Drawskim Parku Narodowym przed bioaugmentacją, 60 dni po bioiaugmentacji konsorcjum mikroorganizmów nieeksponowanych lub 60 dni po bioaugmentacji konsorcjum mikroorganizmów poddanych 12 miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy

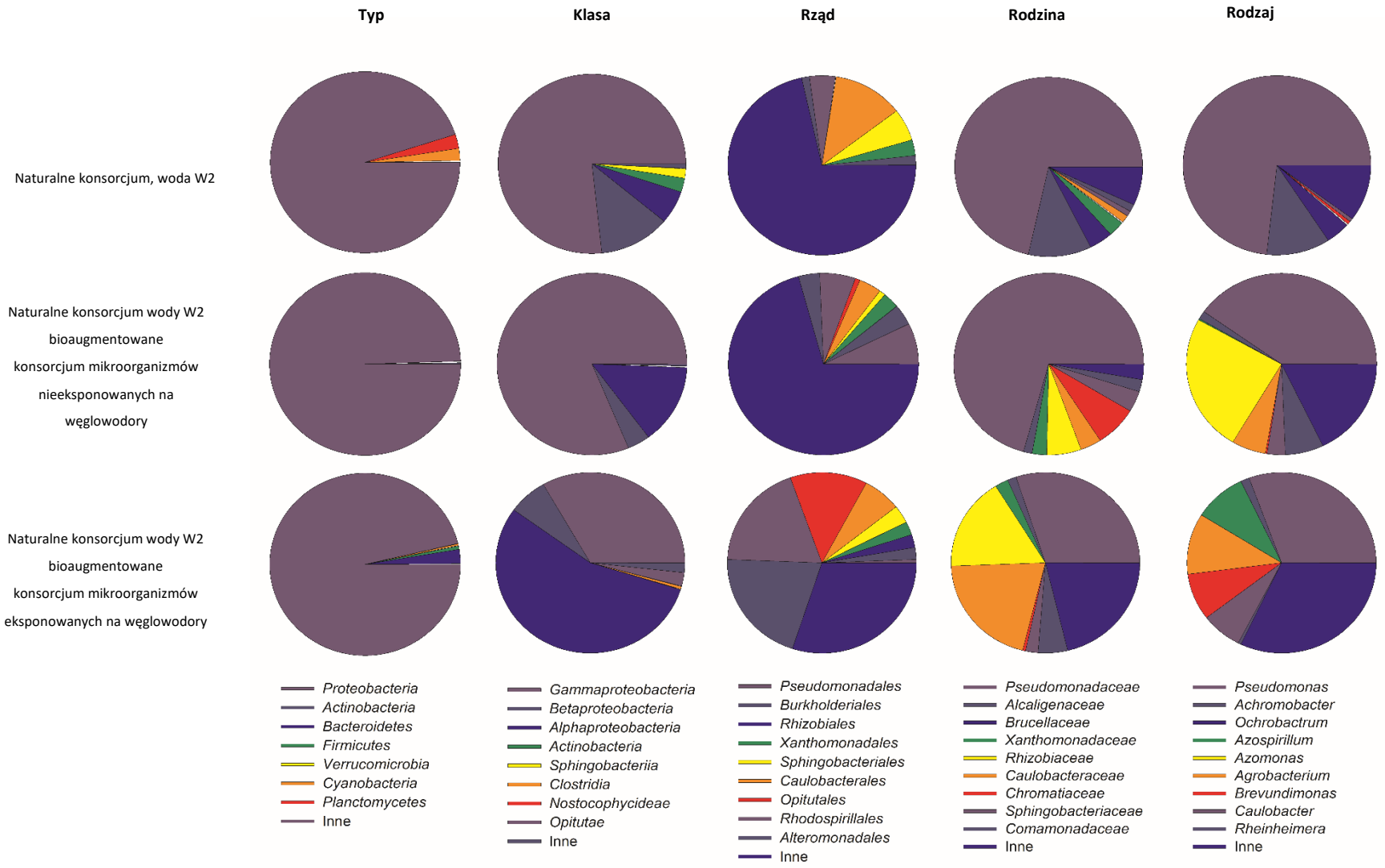
Mikroorganizmy z rodzaju *P. moraviensis* dominowały tylko w próbkach wody W1 biougmentowanych bakteriami nieeksponowanymi po 14 dniach (16,58%), lecz ich liczba była znacznie mniejsza niż w próbie kontrolnej. Poza nimi w próbkach W1+NE zidentyfikowano jeszcze bakterie *Achromobacter insolitus* (15,45%), *Pseudomonas miguale* (9,68%) i *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (4,71%) (Rysunek S1). Liczebność wszystkich pozostałych sklasyfikowanych bakterii wynosiła 17,99% całego wyizolowanego genomu, natomiast 35,6% DNA wyizolowanych bakterii nie zostało sklasyfikowane na poziomie gatunkowym (Rysunek S1). W próbkach pobranych z tych samych układów po 60 dniach prowadzenia procesu biodegradacji nastąpiło znaczące przebudowanie konsorcjum, gdyż znaczna część wyizolowanego DNA nie została przypisana do żadnego gatunku (43,94%), a spośród zidentyfikowanych szczepów dominowały mikrooganizmy z gatunków *Caulobacter crescentus* (8,63%), *Azospirillum rugosum* (5,67%), *Phaeospirillum fulvum* (5,44%) oraz *Variovorax paradoxus* (4,92%). Spośród prawie 500 pozostałych zidentyfikowanych bakterii, udział żadnego z nich nie przekroczył 5% (Rysunek III.21).

W przypadku bioaugmentacji wody W1 bakteriami poddanymi 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory największe zróżnicowanie mikrobiologiczne zaobserwowano również w próbkach pobranych z badanych układów po 60 dniach (Rysunek III. 21). Po tym czasie na poziomie gatunkowym zidentyfikowano bakterie należące do 476 gatunków, co stanowi istotny wzrost bioróżnorodności w porównaniu do 390 bakterii przyporządkowanych na tym poziomie taksonomicznym w próbkach pobranych po 14 dniach. Po 2 tygodniach prowadzenia procesu bioremediacji w próbakch W1+E dominowały bakterie z rodzaju *Pseudomonas* (*P. plecoglossicida* 22,82%), zauważalny był również udział szczepów *P. moraviensis* (4,98%), *P. miguale* (1,99%), dominujących w próbkach wody nie poddawanej bioaugmentacji (Rysunek S1). Skład konsorcjum został jednak znacząco przebudowany w czasie trwania procesu rozkładu zanieczyszczeń, gdyż w próbkach pobranych po 60 dniach bakterie *P. plecoglossicida* stanowiły już zaledwie 3,35% całego wyizolwanego metagenomu. Dominowały zaśmikroorganizmy *Hydrocarboniphaga effusa* (10,8%), *Sphingophyxis ginsengisoli* (9,85%) oraz *Prosthecobacter dejongeli* (5,38%). Zwiększył się również udział procentowy mikrooganizmów, które nie zostały sklasyfikowane na poziomie gatunkowym z 28,51% po 14 dniach do 41,23% po 60 dniach, co również świadczy o dużej bioróżnorodności badanych próbek (Rysunek III. 21).

Próbki pobrane z Jeziora Kierskiego (W2) przed bioaugmentacją charakteryzowały się większą różnorodnością mikrobiologiczną niż próbki pobrane ze zbiornika w Drawieńskim Parku Narodowym po 1 dniu inkubacji z olejem napędowym (Rysunek III.22). W pobranych ze zbiormika W2 próbkach zdecydowanie dominowały mikroorganizmy z rodzaju *Pseudomonas*, stanowiąc ponad 70% całego wyizolowanego genomu (*P. mendocina* 23,24%, *P. tremae* 19,9%, *P. putida* 11,26%, *P. alcaligenes* 3,25%, *P. xanthomarina* 1,55% oraz *P. lundensis* 1,05%). Poza nimi zauważalny był również udział gatunku *Stenotrophomonas retroflexus* (11,26%).

Po bioaugmentacji wody W2 mikroorganizmami nieeksponowanymi udział bakterii z rodzaju *Pseudomonas* systematycznie się zmniejszał stanowiąc 53,62% bakterii po 14 dniach oraz 29,61% po 60 dniach procesu biodegradacji (Rysunek III.22 oraz S2). W obu próbkach pobranych po wskazanych odstępach czasu dominował gatunek *P. aeruginosa* (odpowiednio 34,34% po 14 dniach i 17,54% po 60 dniach). W próbkach pobranych po 60 dniach zmniejszał się także udział bakterii *Stenotrophomonas retroflexus* (z 13,53% do 1,91%) oraz *P. ottidis* (z 3,57% do 2,89%). Zaobserwowano również wzrost w czasie liczby bakterii niesklasyfikowanych na poziomie gatunkowym, z 28,58% do 41,50% oraz bakterii *Azospirillum palatum* (z 1,51% do 7,53%) (Rysunek III.22).

W porównaniu do próbek bioaugmentowanych mikroorganizmami nieeksponowanymi, w układach zawierających wodę W2 i bakterie poddane wcześniejszej ekspozycji na węglowodory (W2+E) w stosunkowo niewielkim stopniu zmienił się udział mikroorganizmów z rodzaju *Pseudomonas* (68,79% po 14 dniach i 70,65% po 60 dniach w porównaniu do 71,16% w wyjściowym mikrobiomie) (Rysunki III. 22 oraz S2). Niewielki jest też, w porównaniu do innych próbek pobieranych po 60 dniach udział bakterii, które nie zostały sklasyfikowane na poziomie gatunkowym (23%). Pomimo mniejszego zróżnicowania gatunkowego próbek, całkowita bioróżnorodność układów 14 i 60 dni po bioaugmentacji zmieniała się w stosunku do układu wyjściowego, na co wskazują wzrastające ilości wszystkich mikroorganizmów zidentyfikowanych na poziomie gatunku, które wynosiły, odpowiednio, 279 dla mikrobiomu wody W2 przez bioaugmantacją; 314 dla mikrobiomu 14 dni po bioaugmentacji oraz 397 dla próbek pobranych 60 dni po bioaugmentcji.



Rysunek III. 22. Względna liczebność mikroorganizmów określona na podstawie analizy metagenomu próbek środowiskowych z uwzględnieniem różnych poziomów taksonomicznych. Woda pobrana z Jeziora Kierskiego (W2) przed bioaugmentacją, 60 dni po bioaugmentacji konsorcjum mikroorganizmów poddanych 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne, alifatyczne lub olej napędowy

Uzyskane dla wszystkich badanych metagenomów wyniki wskazują na znaczący, korzystny wpływ bioaugmentowanych mikroorganizmów na różnorodność biologiczną próbek wody jeziornej. Należy podkreślić, że wprowadzone mikroorganizmy nie zdominowały naturalnej flory mikrobiologicznej badanych środowisk, a jedynie wzbogaciły ją, a dzięki swoim zdolnościom degradacyjnym pozwoliły rozwinąć się również innym grupom mikroorganizmów, zdolnym do degradacji produktów procesów prowadzonych przez bioaugmentowane szczepy. Zaobserwowano również większą różnorodność biologiczną po 60 dniach w próbkach z dodatkiem mikroorganizmów eksponowanych wcześniej na zanieczyszczenia węglowodorowe, w porównaniu do próbek z dodatkiem bakterii wzrastających na podłożu z dodatkiem bursztynianu sodu. Może to wskazywać na bardziej kompleksowy rozkład substratów lub przeprowadzenie procesów degradacyjnych w krótszym czasie przez bakterie poddane wcześniejszej ekspozycji na zanieczyszczenia, co umożliwia szybszy i intensywniejszy rozwój pozostałych mikroorganizmów w danym habitacie.

5.3. Dyskusja wyników

Możliwość wykorzystania badanych mikroorganizmów jest jednym z ważnych elementów badań nad opracowywaniem nowych rozwiązań dla procesów bioremediacji środowiska. Przedstawione wyniki analiz efektywności biodegradacji oleju napędowego przez układy bioaugmentowane mikroorganizmami wskazują na korzystny wpływ tego zabiegu na usuwanie zanieczyszczeń węglowodorowych. Ponadto, odnotowana największa spośród badanych efektywność układów z dodatkiem mikroorganizmów poddanych 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory wskazuje na zasadność przeprowadzonego procesu ekspozycji mikroorganizmów. Jak wykazano w poprzednich sekcjach (Wyniki badań, rodziały 2-4), zarówno doniesienia literaturowe, jak i wyniki przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej potwierdzają lepsze przystosowanie oraz większą aktywność metaboliczną komórek, które miały wcześniej kontakt z węglowodorami, co bezpośrednio wpływa na efektywność procesu degradacji zanieczyszczeń.

Opisywane w publikacjach przykłady wykorzystania bioaugmentacji do usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych skupiają się głównie na aplikacji odpowiednio dobranych bakterii do próbek zanieczyszczonej gleby. Należy podkreślić, że najlepsze wyniki uzyskiwane są dla mikroorganizmów wyizolowanych z silnie zanieczyszczonych środowisk,

sugerując że ekspozycja komórek na wysokie stężenie węglowodorów pozwala komórkom wykształcić efektywne mechanizmy przystosowujące je do degradacji szkodliwych związków. Pacwa-Płociniczak i in. [48] wykorzystali bakterie *Rhodococcus* CD130 i CD167 wyizolowane z terenu byłej rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach do usuwania węglowodorów z gleby pobranej z tego terenu, osiągając efektywność około 30% w ciągu 182 dni. Jeszcze wyższą, nawet 70% efektywność procesu bioremiediacji udało się uzyskać Roy

i in. [49], wykorzystującym do bioremediacji gleby z terenu rafinerii mikroorganizmy wyizolowane z oczyszczalni ścieków przy rafinerii. Również Poi i in. [50] wykorzystali osad czynny z oczyszczalni ścieków na terenie rafinerii jako źródło mikroorganizmów aplikowanych w bioaugmentacji gleby. Safdari i in. [54] oraz Innemanova i in. [52] wyizolowali bakterie z gleby długotrwale skażonej węglowodorami i również wykorzystali je w bioaugmentacji tego terenu, natomiast Wu i in. [53] oraz Ramadass i in. [55] wykazali skuteczność bioaugmentacji zanieczyszczonej gleby mikroorganizmami wyizolwoanymi z terenów innych niż gleba poddawana bioremediacji. Należy jednak podkreślić, że zarówno szczep *Acinetobacter* SZ-1 zastosowany przez Wu i in. [53], jak i bakterie z gatunków *P. aeruginosa* TPHK-4 i *P. putida* TPHK-1 wykorzystane przez Ramdass i in. [55] pochodziły z terenów zanieczyszczonych węglowodorami i zostały wcześniej przeanalizowane pod kątem ich właściwości bioremediacyjnych.

Szkodliwe substancje występujące w środowisku, takie jak węglowodory, wymuszają przemiany strukturalne konsorcjów bakteryjnych, eliminując najsłabsze gatunki i promując powstawanie konsorcjów wyspecjalizowanych mikroorganizmów [203]. Obserwowane zmiany struktury profilu bakteryjnego podczas degradacji ksenobiotyków są wynikiem dostosowywania szlaków metabolicznych i ewolucji genetycznej bakterii mających na celu kompleksowe usuwanie zanieczyszczeń [204]. Analiza metagenomu populacji zajmującej dany habitat może dostarczyć ważnych informacji na temat filogenetycznych oraz taksonomicznych powiązań między poszczególnymi gatunkami i ułatwić ocenę ich zdolności do degradacji wybranych związków. Devpura i in. [205] przeprowadzili analizę genetyczną i taksonomiczną mikroorganizmów wyizolowanych z terenów industrialnych w Sachinie (Indie), stwierdzając dominację bakterii z rodzajów *Streptomyces*, *Escherichia*, *Candidatus*, *Solibacter*, *Conexibacter*, *Planctomyces*, *Geobacter*, *Candidatus Koribacter*, *Sorangium*,

Mycobacterium, *Anaeromyxobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* i innych, zaznaczając jednocześnie, że już na poziomie typu prawie 5% puli wyizolowanego DNA nie zostało sklasyfikowanego taksonomicznie. Również Lenchi i in. [206] zaobserwowali znaczący udział niesklasyfikowanych bakterii w materiale genetycznym wyizolowanym z próbek wody wpompowywanej do złóż ropy naftowej (ang. *water injection*). Ponadto, w badanych przez nich próbkach dominowały klasy α-, β- i γ- *Proteobakterie* [206]. Sutton i in. [207] po przebadaniu 26 próbek gleby z terenów zanieczyszczonych olejem napędowym stwierdzili znaczące zmiany struktury konsorcjum bakteryjnego, identyfikując we wszystkich badanych próbkach bakterie z typów *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* oraz *Chloroflexi* jako dominujące. Z kolei Wang i in. [208] zaobserwowali dominację domeny *Archea* w fazie wodnej oraz domeny *Bacteria* (głównie z rodzajów *Pseudomonas* oraz *Sphingomonas*) w fazie organicznej wody użytej do zalania miejsc po wydobyciu ropy naftowej. Jak wskazują Abbai i Pillay [209] dominacja β- *Proteobakterii* i obecność produktów genów odporności na stres metaboliczny są jednymi z markerów przystosowania danej populacji do degradacji węglowodorów. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki analiz puli DNA bakterii wyizolowanych ze zbiorników słodkowodnych sugerują duże zróżnicowanie możliwości dostosowawczych mikroorganizmów z różnych środowisk do degradacji oleju napędowego. Niemniej jednak, należy podkreślić zaobserwowany korzystny wpływ bioaugmentacji na bioróżnorodność bakterii zajmujących dany habitat w przypadku zanieczyszczenia go węglowodorami ropopochodnymi.

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania pozwoliły na zrealizowanie założonego celu pracy, jakim było określenie wpływu ekspozycji wybranych mikroorganizmów na węglowodory aromatyczne (butylobenzenu, propylobenzenu, *tert*-butylobenzenu, *sec*-butylobenzenu i ksylenu), alifatyczne (*izo*oktanu, nonanu, dodekanu, tridekanu i heksadekanu) oraz olej napędowy, na zdolności bakterii do mikrobiologicznego rozkładu badanych zanieczyszczeń. Zebrane w Tabeli IV. 1 wyniki przeprowadzonych badań wskazują na zróżnicowany wpływ długotrwałej ekspozycji komórek na węglowodory na efektywność przeprowadzanych przez nie procesów biodegradacji zanieczyszczeń. W przypadku każdego z testowanych szczepów zaobserwowano zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ wcześniejszego kontaktu z węglowodorami, a poszczególne szczepy w różny sposób reagowały na kontakt z poszczególnymi związkami.

W przypadku szczepu *R. planticola* M01 zaobserwowano pozytywny wpływ długotrwałej ekspozycji komórek zarówno na węglowodory aromatyczne, jak i alifatyczne. Bakterie *R. planticola* M01 eksponowane na te związki były zdolne do usuwania średnio ponad 90% związków alifatycznych i aromatycznych w testach biodegradacyjnych. Komórki tego szczepu charakteryzowały się wzrostem hydrofobowości powierzchni oraz obniżeniem potencjału elektrokinetycznego. Zaobserwowano również wzrost przepuszczalności błon komórkowych oraz polidyspersyjności badanych układów. W przypadku komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne najistotniejszą zaobserwowaną zmianą jest duży wzrost aktywności 2,3-dioksygenazy katecholowej i równoczesny spadek aktywności transferazy glutationowej, co może wskazywać na zaangażowanie 2,3-DO w degradację związków aromatycznych przez bakterie szczepu *R. planticola* M01. Biorące pod uwagę podwyższoną aktywność tej oksygenazy oraz wysoką biodegradację węglowodorów aromatycznych można również przypuszczać, że efektywne metabolizowanie tych węglowodorów przez komórki wpływa na zmniejszenie ich toksyczności w stosunku do badanych mikroorganizmów, o czym może świadczyć spadek aktywności GST. Zmniejszenie aktywności tego enzymu można także zaobserwować w przypadku komórek *R. planticola* M01 eksponowanych na węglowodory alifatyczne, Ponadto, znacznie zwiększona całkowita przepuszczalność błony tych komórek wraz z innymi odnotowanymi modyfikacjami powierzchniowymi może sugerować zmiany w kierunku łatwiejszego przyłączania związków alifatycznych i transportowania ich do wnętrza komórek.

Tabela IV. 1. Główne właściwości komórek analizowanych szczepów oraz efektywność przeprowadzanych przez nie procesów biodegradacji węglowodorów

Szczep	Ekspozycja	Właściwości powierzchniowe								Bioderagacja [%]		
					Przepuszczalność błon		Aktywność enzymatyczna					
		CSH[1] [%]	ζ[1] [mV]	PdI[2]	TMP[3] [%]	IMP[4] [µM ONP/min/ml]	1,2-DO[5] [U/mg]	2,3-DO[6] [U/mg]	GST[7] [U/ml]	AR[8]	AL[8]	ON[9]
M01	-	6,72	-10,30	0,13	0,08	0,06	1903,98	1,65	0,20	43,31	65,96	35,33
	AR	36,80	-14,35	0,34	0,64	0,14	654,30	12,48	0,13	**98,85**	71,98	14,99
	AL	30,74	-20,15	0,26	0,85	0,13	814,46	5,15	0,12	45,16	**90,68**	20,76
	ON	33,94	-18,77	0,11	0,59	0,20	208,45	4,57	0,12	45,26	68,76	**16,85**
M03	-	11,71	-12,27	0,02	0,31	0,06	110,05	1,97	0,11	37,31	65,32	23,36
	AR	44,98	-27,50	0,26	0,32	0,10	322,31	1,15	0,11	**98,55**	37,28	32,63
	AL	43,94	-21,93	0,24	0,40	0,07	2258,01	4,29	0,16	55,88	**43,93**	39,17
	ON	43,47	-17,47	0,27	0,51	0,10	2346,21	5,60	0,12	59,07	62,98	**41,87**
M1B	-	13,99	-18,50	0,16	0,30	0,07	233,82	2,94	0,16	27,59	19,28	6,94
	AR	37,15	-14,65	0,38	0,37	0,10	182,90	2,92	0,12	**18,93**	79,26	6,57
	AL	27,29	-17,25	0,20	0,59	0,10	43,60	0,83	0,20	36,40	**66,08**	7,30
	ON	31,21	-22,27	0,23	0,51	0,08	215,19	1,39	0,13	40,89	27,02	**8,17**

M01 – *R. planticola* Mo1; M03 – *R. ornithinolytica* M03; M1B – *A. calcoaceticus* M1B; AR – węglowoodry aromatyczne; AL. – węglowodory alifatyczne; ON – olej napędowy; [1] zmierzone po 12 miesiącach ekspozycji; [2] indeks polidyspersyjności; [3] całkowita przepuszczalność błony komórkowej; [4] przepuszczalność wewnętrznej błony komórkowej; [5] 1,2-dioksygenaza katecholowa; [2] 2,3-dioksygenaza katecholowa, [7] transferaza glutationowa; [8] średnia biodegradacja dla poszczególnych węglowodorów z mieszaniny zmierzona po 14 dniach; [9] biodegradacja zmierzona po 14 dniach; kolorami oznaczono: zielonym – wzrost biodegradacji; czerwonym - spadek biodegradacji; czarnym – brak istotnych zmian

Szczep *R. ornithinolytica* M03 eksponowany na węglowodory aromatyczne charakteryzował się również wysoką zdolnością do biodegradacji tej grupy związków, jednak w tym przypadku jedną z głównych ról w ich efektywnym metabolizowaniu odgrywają 1,2-dioksygenzay katecholowe, których aktywność wzrosła 3-krotnie w porównaniu do próby kontrolnej. Komórki szczepu *R. ornithinolytica* M03 poddane ekspozycji na węglowodory aromatyczne charakteryzowały się również najwyższymi spośród badanych wartościami bezwzględnymi hydrofobowości powierzchni komórek oraz potencjału elektrokinetycznego. Wywołane w wyniku ekspozycji na węglowodory aromatyczne zmiany właściwości tych komórek skutkowały prawie 3-krotnym wzrostem efektywności biodegradacji związków aromatycznych przez te komórki w porównaniu do komórek nieeksponowanych. Porównywalnie duże zmiany wartości CHS i potencjału elektrokinetycznego komórek eksponowanych na węglowodory alifatyczne nie przyniosły oczekiwanych efektów w przypadku biodegradacji tych związków, a komórki eksponowane na związki alifatyczne były mniej efektywne w ich metabolizowaniu niż komórki nieeksponowane. Uwagę zwraca również bardzo duży wzrost aktywności 1,2-dioksygenazy katecholowej, zarówno w komórkach szczepu *R. ornithinolytica* M03 eksponowanych na węglowodory alifatyczne, jak i olej napędowy. W przypadku biodegradacji węglowodorów alifatycznych zaobserwowano również wzrost aktywności transferazy glutationowej, odpowiedzialnej za ochronę komórek przed szkodliwym działaniem ksenobiotyków, co może wskazywać, że obecne w podłożu związki alifatyczne były dla nich szkodliwe. Bakterie *R. ornithinolytica* M03 poddane długotrwałej ekspozycji na olej napędowy charakteryzowały się największą spośród wszystkich badanych szczepów zdolnością do jego biodegradacji, co wskazuje na korzystny wpływ przeprowadzonego procesu ekspozycji na efektywność komórek w usuwaniu tego typu zanieczyszczeń. Przeprowadzone przez komórki eksponowane na olej napędowy modyfikacje właściwości powierzchniowych oraz wzrost aktywności enzymatycznej skutkowały również wzrostem biodegradacji węglowodorów aromatycznych oraz utrzymaniem na zbliżonym do próby kontrolnej poziomie degradacji związków alifatycznych. Należy tutaj podkreślić, że główną różnicą występującą między komórkami eksponowanymi na związki alifatyczne i olej napędowy jest zmiana potencjału elektrokientycznego komórek. Zaobserwowane znaczące różnice w zdolnościach degradacyjnych mogą wskazywać, że zmiana potencjału elektrokinetycznego jest jedną

z ważnych modyfikacji podejmowanych przez komórki podczas kontaktu ze związkami alifatycznymi, jednak zbyt duże obniżenie wartości tego parametru skutkuje spadkiem biodegradacji węglowodorów alifatycznych. Na podstawie przeprowadzonych analiz można wnioskować, że optymalne wartości potencjału elektrokinetycznego komórek efektywnie degradujących związki alifatyczne nie powinny przekraczać -21 mV.

Bakterie szczepu *A. calcoaceticus* M1B eksponowane na badane zanieczyszczenia węglowodorowe charakteryzowały się wzrostem efektywności usuwania węglowodorów aromatycznych, alifatycznych oraz oleju napędowego. Wyjątkiem są w tym przypadku układy zawierające komórki poddane ekspozycji na węglowodory aromatyczne, w których biodegradacja związków aromatycznych była o 30% niższa niż w hodowli z komórkami nieeksponowanymi. U mikroorganizmów szczepu *A. calcoaceticus* M1B poddanych ekspozycji na węglowodory aromatyczne zaobserwowano również spadek bezwzględnej wartości potencjału elektrokinetycznego komórek, ich aktywności enzymatycznej oraz wzrost przepuszczalności błon komórkowych. Ponadto, komórki wzrastające na podłożu z dodatkiem węglowodorów aromatycznych charakteryzowały się małą liczebnością, co może wskazywać na negatywne oddziaływanie długotrwałej ekspozycji na węglowodory aromatyczne na bakterie *A. calcoaceticus* M1B. Z kolei w komórkach tego szczepu eksponowanych na węglowodory alifatyczne odnotowano również modyfikacje właściwości powierzchniowych, wśród których uwagę zwraca niewielki spadek potencjału dzeta oraz znacznie obniżona aktywność dioksygenaz katecholowych. Obserwowany wzrost efektywności biodegradacji węglowodorów alifatycznych przez te komórki wskazuje, że enzymy te nie są zaangażowane z usuwanie zanieczyszczeń z tej grupy. Ponadto, znaczący wzrost całkowitej przepuszczalności błony komórkowej mógł być pozytywnie skorelowany z obserwowanym wzrostem biodegradacji węglowodorów alifatycznych. Mikroorganizmy *A. calcoaceticus* M1B poddane ekspozycji na olej napędowy charakteryzowały się również modyfikacjami właściwości powierzchniowych w kierunku cech bardziej hydrofobowych, wzrostem przepuszczalności błony komórkowej oraz zwiększonym usuwaniem badanych substancji.

Analizując wszystkie badane mikroorganizmy poddane ekspozycji na olej napędowy, a następnie degradujące ten substrat, nie można wyróżnić głównych właściwości predysponujących komórki do efektywnej degradacji ON. Różnice występujące pomiędzy

właściwościami poszczególnych szczepów nie pozwalają na jednoznaczne skorelowanie którejś z badanych cech ze zwiększoną lub zmniejszoną biodegradacją. Można zatem wnioskować, że metabolizm oleju napędowego wymaga zaangażowania wielu procesów w komórkach różnych szczepów, a złożoność tej mieszaniny wymusza ich indywidualne przystosowanie do prowadzenia procesów biodegradacji oleju napędowego. Cechą wspólną komórek predysponujących je do efektywnego usuwania oleju napędowego jest podwyższona polidyspersyjność badanych układów. Najlepsze wyniki biodegradacji uzyskano dla układów w których wartość tego parametru była w zakresie 0,3-0,5; a wyższa polidyspersyjność obniżała zdolności biodegradacyjne komórek.

Ponadto, przeprowadzone szczegółowe analizy właściwości komórek eksponowanych na węglowodory aromatyczne udowadniają duże znaczenie zmian płynności błony komórkowej w efektywnym transporcie i metabolizowaniu tych zanieczyszczeń oraz znaczące różnice w poziomach akumulacji białek oraz aktywności transkrypcyjnej genów pomiędzy komórkami. Należy zwrócić uwagę, że nawet szczepy *R. planticola* M01 oraz *R. ornithinolytica* M03 należące do tego samego rodzaju charakteryzowały się różnymi profilami proteomicznymi. Komórki analizowanych szczepów *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 oraz *A. calcoaceticus* M1B poddane 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory aromatyczne charakteryzowały się znacząco podwyższonym poziomem akumulacji białek związanych z aktywnym transportem zanieczyszczeń do komórek. Potwierdzono również niewielką trwałość modyfikacji profilu białkowego komórek wywołanego 12-miesięczną ekspozycją na węglowodory aromatyczne. Dowodem tego są zaobserwowan zmiany „powrotne" profilu białkowego mikroorganizmów przeniesionych po 12-miesięcznej ekspozycji na węglowodory do hodowli z glukozą jako źródłem węgla. Ze względu na duże zaangażowanie wielu procesów metabolicznych oraz ekspresję i akumulację znaczącej liczby białek w wyniku ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe, zmiany profilu białkowego w kierunku profilu komórek nieeksponowanych są przez bakterie predysponowane po ustaniu działania czynnika stresowego.

Aby podsumować wyniki przeprowadzonych analiz, poniżej zebrano najważniejsze obserwacje i wnioski sformułowane po ich przeanalizowaniu.

1) Z próbek gleb z różnych środowisk wyizolowano trzy szczepy zdolne do wzrostu na podłożu zawierającym olej napędowy jako jedyne źródło węgla i energii, a na podstawie analiz molekularnych zidentyfikowano je jako *Raoultella platicola* M01, *Raoultella ornithinolytica* M03 oraz *Acinetobater calcoaceticus* M1B.
2) Analizy zmian właściwości powierzchniowych komórek poddanych ekspozycji na węglowodory pozwoliły stwierdzić, że wrażliwość komórek na badane węglowodory uległa zmniejszeniu, poprzez wywołanie modyfikacji strukturalnych i metabolicznych.
3) Ze względu na znaczące różnice przeprowadzanych przez bakterie eksponowane na węglowodory modyfikacji właściwości nie można jednoznacznie wyróżnić ich najważniejszych cech predysponujących je do degradacji węglowodorów, jednak zaobserwowano istnienie wartości granicznych (potencjału elektrokinetycznego czy polidyspersyjności badanych układów) warunkujących zwiększenie efektywności biodegradacji ksenobiotyków przez mikroorganizmy.
4) Zmiany aktywności proteomu bakterii poddanych krótkotrwałej i długotrwałej ekspozycji na zanieczyszczenia węglowodorowe charakteryzują się różnym przebiegiem. Krótkotrwała ekspozycja wywoływała głównie modyfikacje struktury błony komórkowej, natomiast długotrwała powodowałą zmiany mające na celu przystosowanie metaboliczne bakterii.
5) Uzyskana w wyniku długotrwałej ekspozycji zmniejszona wrażliwość bakterii na badane węglowodory aromatyczne, alifatyczne i olej napędowy oraz ich podwyższona aktywność metaboliczna skutkuje wzrostem efektywności procesów biodegradacji zanieczyszczeń prowadzonych przez badane mikroorganizmy poddane długotrwałej ekspozycji na węglowodory.
6) Mikroorganizmy poddane wcześniejszej ekspozycji na związki węglowodorowe zastosowane do bioaugmentacji próbek wodnych mogą mieć korzystny wpływ na efektywność procesów usuwania zanieczyszczeń węglowodorowych w środowisku naturalnym oraz promować zwiększenie ich bioróżnorodności.

BIBLIOGRAFIA

1. Rai, P. K. Particulate matter and its size fractionation. In *Biomagnetic monitoring of particulate matter*; Rai, P. K., Ed.; Elsevier, 2016; pp. 1–13, ISBN 978-0-12-805135-1.
2. Varjani, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* **2017**, *223*, 277–286, doi:10.1016/J.BIORTECH.2016.10.037.
3. Khan, M. A. I.; Biswas, B.; Smith, E.; Naidu, R.; Megharaj, M. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. *Chemosphere* **2018**, *212*, 755–767, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.08.094.
4. Logeshwaran, P.; Megharaj, M.; Chadalavada, S.; Bowman, M.; Naidu, R. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ. Technol. Innov.* **2018**, *10*, 175–193, doi:10.1016/J.ETI.2018.02.001.
5. McAlexander, B. L.; Tuggle, K. V. Estimating remediation and contaminant respiration emissions for alternatives comparisons at petroleum spill sites. *Remediat. J.* **2015**, *25*, 53–67, doi:10.1002/rem.21432.
6. Oyeneyin, B. Introduction to the hydrocarbon composite production system. *Dev. Pet. Sci.* **2015**, *63*, 11–128, doi:10.1016/B978-0-444-62637-0.00002-6.
7. Sakai, Y.; Maeng, J. H.; Kubota, S.; Tani, A.; Tani, Y.; Kato, N. A non-conventional dissimilation pathway for long chain n-alkanes in *Acinetobacter* sp. M-1 that starts with a dioxygenase reaction. *J. Ferment. Bioeng.* **1996**, *81*, 286–291, doi:10.1016/0922-338X(96)80578-2.
8. Abbasian, F.; Lockington, R.; Mallavarapu, M.; Naidu, R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *176*, 670–699, doi:10.1007/s12010-015-1603-5.
9. Wang, M.; Wang, C.; Hu, X.; Zhang, H.; He, S.; Lv, S. Distributions and sources of petroleum, aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from Bohai Bay and its adjacent river, China. *Mar. Pollut. Bull.* **2015**, *90*, 88–94, doi:10.1016/j.marpolbul.2014.11.017.
10. Rushdi, A. I.; Al-Mutlaq, K.; El-Mubarak, A. H.; El-Otaibi, M. Occurrence and sources of aliphatic hydrocarbons in surface soils from Riyadh city, Saudi Arabia. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2013**, *12*, 9–18, doi:10.1016/J.JSSAS.2012.04.002.

11. Seo, J. S.; Keum, Y. S.; Li, Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2009**, *6*, 278–309, doi:10.3390/ijerph6010278.
12. Tilley, S. K.; Fry, R. C. Priority environmental contaminants: understanding their sources of exposure, biological mechanisms, and impacts on health. In *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*; Fry, R. C., Ed.; Academic Press: London, 2015; pp. 117–169, ISBN 9780128015643.
13. Bugaj, C.; Olszewska, J.; Pater, K.; Pawłowska, B.; Puchowicz, A.; Rutkowska, J.; Stokłosa, T.; Surygała, J.; Śliwka, E. *Ropa naftowa: właściwości, produkty, przetwarzanie*; Surygała, J., Ed.; Wydawnictwa Naukowo-Techniczne: Warszawa, 2006; ISBN 83-204-3256-1.
14. Kluk, D. Oznaczanie składu ropy naftowej z wykorzystaniem aplikacji SARA. *Nafta-Gaz* **2006**, *LXVI*, 255–261.
15. Das, N.; Chandran, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res. Int.* **2011**, 1–13, doi:10.4061/2011/941810.
16. Rakowska, J.; Radwan, K.; Ślosorz, Z.; Pietraszek, E.; Łudzik, M.; Suchorab, P. *Usuwanie substancji ropopochodnych z dróg i gruntów*; Rakowska, J., Ed.; Centrum Naukowo-Badawcze Ochrony Przeciwpożarowej Państwowy Instytut Badawczy: Józefów, 2012; ISBN 978-83-61520-53-5.
17. Thompson, T.; Fawell, J.; Kunikane, S.; Jackson, D.; Appleyard, S.; Callan, P.; Bartram, J.; Kingston, P. *Chemical safety of drinking-water: Assessing priorities for risk management*; Geneva, 2007.
18. Pruss-Ustun, A.; Wolf, J.; Corvalan, C.; Bos, R.; Neira, M. *Preventing disease through healthy environments: A global assessment of the burden of disease from environmental risks*; Geneva, 2016.
19. Ministerstwo Środowiska *Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi*; Dziennik Ustaw 2016.
20. Environmental Agency *Soil Guideline Values for benzene, toluene, ethylbenzene and xylens in soil*; Soil Guideline Value Reports: Wielka Brytania, 2009.

21. Minister of Housing Spatial Planning and the Environment *Decree of 22 November 2007 containing rules with respect to the quality of soil (Soil Quality Decree)*; Bulletin of Acts, Orders and Decrees of the State of the Netherlands: Holandia, 2007.
22. Landwirtschaftliche Bodennutzung *Rozporządzenie o ochronie gleb i terenach zanieczyszczonych (BBodSchV)*; Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten: Niemcy, 2017.
23. Ministry for the Environment *Guidelines for Assessing and Managing Petroleum Hydrocarbon Contaminated Sites in New Zealand*; New Zealand Legislation: Nowa Zelandia, 2011.
24. Canadian Council of Ministers of the Environment Health *Canada-Wide Standards For Petroleum Hydrocarbons (PHC) In Soil, Canadian Council of Ministers of the Environment*; Canadian Council of Ministers of the Environment: Kanada, 2008;
25. Gałązka, A. Przegląd biologicznych metod oczyszczania gleb skażnych wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi. *Zesz. Probl. Postępów Nauk Rol.* **2009**, *535*, 103–110, doi:bwmeta1.element.agro-101755bf-c240-415f-9cc9-096b2d24127b.
26. Boopathy. R. Factors limiting bioremediation technology. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 63–67.
27. Leahy, J. G.; Colwell, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 305–315.
28. Wolicka, D.; Borkowski, A. Microorganisms and crude oil. In *Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil-contaminated sites*; Romero-Zeron, L., Ed.; InTechOpen: London, 2012; pp. 113–142, ISBN 978-953-51-0629-6.
29. Kunicki-Goldfinger, W. J. H. *Życie bakterii*; Kunicki-Goldfinger, W. J. H., Ed.; 7th ed.; Wydawnictwo naukowe PWN: Warszawa, 2007; ISBN 9788301143787.
30. Hottes, A. K.; Freddolino, P. L.; Khare, A.; Donnell, Z. N.; Liu, J. C.; Tavazoie, S. Bacterial adaptation through loss of function. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003617, doi:10.1371/journal.pgen.1003617.
31. Hua, F.; Wang, H. Q. Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2014**, *28*, 165–175, doi:10.1080/13102818.2014.906136.
32. Reichenberg, F.; Mayer, P. Two complementary sides of bioavailability: accessibility

and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 1239–1245.

33. Kaczorek, E.; Pacholak, A.; Zdarta, A.; Smułek, W.; Kaczorek, E.; Pacholak, A.; Zdarta, A.; Smułek, W. The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase. *Colloids and Interfaces* **2018**, *2*, 35, doi:10.3390/colloids2030035.
34. Paliwoda, A.; Nowak, A. Czynniki warunkujące zdolności adhezyjne bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Postępy Mikrobiol.* **2017**, *56*, 196–204.
35. Oliveira, R.; Azeredo, J.; Teixeira, P.; Fonseca, A. P. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. In *Biofilm community interactions: chance or necessity?*; Gilbert, P., Allison, D., Brading, M., Verran, J., Walker, J., Eds.; Bioline: Cardiff, 2001; pp. 11–22.
36. Baumgarten, T.; Sperling, S.; Seifert, J.; von Bergen, M.; Steiniger, F.; Wick, L. Y.; Heipieper, H. J. Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 6217–6224, doi:10.1128/AEM.01525-12.
37. Obuekwe, C. O.; Al-Jadi, Z. K.; Al-Saleh, E. S. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2009**, *63*, 273–279, doi:10.1016/j.ibiod.2008.10.004.
38. Chakraborty, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degrading Burkholderia strains and their interactions with NAPLs and surfaces. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *78*, 101–108, doi:10.1016/j.colsurfb.2010.02.019.
39. Halder, S.; Yadav, K.; Kumar, Sarkar, R.; Mukherjee, S.; Saha, P.; Haldar, S.; Karmakar, S.; Sen, T. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *Springerplus* **2015**, *4*, 672–686.
40. Sikkema, J.; de Bont, J. A.; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 201–22.
41. Hearn, E. M.; Patel, D. R.; van den Berg, B. Outer-membrane transport of aromatic hydrocarbons as a first step in biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 8601–8606, doi:10.1073/pnas.0801264105.

42. Miyata, N.; Iwahori, K.; Foght, J. M.; Gray, M. R. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 363–369, doi:10.1128/AEM.70.1.363-369.2004.

43. Bateman, J. N.; Speer, B.; Feduik, L.; Hartline, R. A. Naphthalene association and uptake in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **1986**, *166*, 155–161.

44. Shishido, M.; Toda, M. Apparent zero-order kinetics of phenol biodegradation by substrate-inhibited microbes at low substrate concentrations. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*, 709–717, doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19960620)50:6<709::AID-BIT12>3.0.CO;2-9.

45. Verdin, A.; Lounès-Hadj Sahraoui, A.; Newsam, R.; Robinson, G.; Durand, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ. Pollut.* **2005**, *133*, 283–291, doi:10.1016/j.envpol.2004.05.040.

46. Nunes, C.; Sousa, C.; Ferreira, H.; Lucio, M.; Lima, J. L. F. C.; Tavares, J.; Cordeiro-da-Silva, A.; Reis, S. Substituted phenols as pollutants that affect membrane fluidity. *J. Environ. Biol.* **2008**, *29*, 733–738.

47. Podsiadło, Ł.; Krzyśko-Łupicka, T. Techniki bioremediacji substancji ropopochodnych i metody oceny ich efektywności. *Inżynieria i Ochr. Środowiska* **2013**, *16*, 459–476.

48. Pacwa-Płociniczak, M.; Czapla, J.; Płociniczak, T.; Piotrowska-Seget, Z. The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2019**, *169*, 615–622, doi:10.1016/J.ECOENV.2018.11.081.

49. Roy, A.; Dutta, A.; Pal, S.; Gupta, A.; Sarkar, J.; Chatterjee, A.; Saha, A.; Sarkar, P.; Sar, P.; Kazy, S. K. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresour. Technol.* **2018**, *253*, 22–32, doi:10.1016/J.BIORTECH.2018.01.004.

50. Poi, G.; Aburto-Medina, A.; Mok, P. C.; Ball, A. S.; Shahsavari, E. Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium. *Ecol. Eng.* **2017**, *102*, 64–71, doi:10.1016/J.ECOLENG.2017.01.048.

51. Lang, F. S.; Destain, J.; Delvigne, F.; Druart, P.; Ongena, M.; Thonart, P. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments under different strategies: natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1. *Water, Air, Soil Pollut.* **2016**, *227*, 297, doi:10.1007/s11270-016-2999-4.

52. Innemanová, P.; Filipová, A.; Michalíková, K.; Wimmerová, L.; Cajthaml, T. Bioaugmentation of PAH-contaminated soils: a novel procedure for introduction of bacterial degraders into contaminated soil. *Ecol. Eng.* **2018**, *118*, 93–96, doi:10.1016/J.ECOLENG.2018.04.014.

53. Wu, M.; Dick, W. A.; Li, W.; Wang, X.; Yang, Q.; Wang, T.; Xu, L.; Zhang, M.; Chen, L. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2016**, *107*, 158–164, doi:10.1016/J.IBIOD.2015.11.019.

54. Safdari, M.-S.; Kariminia, H.-R.; Rahmati, M.; Fazlollahi, F.; Polasko, A.; Mahendra, S.; Wilding, W. V.; Fletcher, T. H. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* **2018**, *342*, 270–278, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2017.08.044.

55. Ramadass, K.; Megharaj, M.; Venkateswarlu, K.; Naidu, R. Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Sci. Total Environ.* **2018**, *636*, 968–974, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2018.04.379.

56. Joyner, R. P.; Tang, J. H.; Helenius, J.; Dultz, E.; Brune, C.; Holt, L. J.; Huet, S.; Müller, D. J.; Weis, K. A glucose-starvation response regulates the diffusion of macromolecules. *Elife* **2016**, *5*, doi:10.7554/eLife.09376.

57. Olszewska, M.; Łaniewska-Trokenheim, Ł. Odpowiedź bakterii fermentacji mlekowej na stres - stadium vbnc. *Żywn. Nauk. Technol. Jakosc/Food. Sci. Technol. Qual.* **2013**, *20*, 15–28.

58. Knight, K. Stress: from cells to ecosystems. *J. Exp. Biol.* **2014**, *217*, 1–4, doi:10.1242/jeb.100727.

59. Fulda, S.; Gorman, A. M.; Hori, O.; Samali, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, *2010*, 214074, doi:10.1155/2010/214074.

60. Henderson, B.; Allan, E.; Coates, A. R. M. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 3693–3706, doi:10.1128/IAI.01882-05.

61. Tymoczko, J. L.; Berg, J. M.; Stryer, L. *Biochemia*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2009; ISBN 9788301158118.

62. Cechowska-Pasko, M. Białka opiekuńcze siateczki śródplazmatycznej. *Postepy Biochem.* **2009**, *55*, 416–424.

63. Karpińska, A.; Gromadzka, G. Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne-znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **2013**, *67*, 43–53.

64. Ladino-Orjuela, G.; Gomes, E.; da Silva, R.; Salt, C.; Parsons, J. R. Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In *Reviews on Environmental Contamination and Toxicology*; de Voogt, W., Ed.; Springer: Cham, 2016; pp. 105–121.

65. Kwapisz, E. Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej. *Biotechnologia* **2006**, *2*, 166–188.

66. Brzeszcz, P.; Kaszycki, J. Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility., doi:10.1007/s10532-018-9837-x.

67. Sierra-Garcia, I. N.; de Oliveira, V. M. Microbial hydrocarbon degradation: Efforts to understand biodegradation in petroleum reservoirs. In *Biodegradation - Engineering and Technology*; Chamy, R., Rosenkranz, F., Eds.; InTech Open: Lonon, 2013; pp. 47–72.

68. Guzik, U.; Hupert-Kocurek, K.; Wojcieszysk, D. Intradiol dioxygenases — the key enzymes in xenobiotics degradation. In *Biodegradation of Hazardous and Special Products*; Chamy, R., Rosenkranz, F., Eds.; InTech Open: London, 2013; pp. 129–153.

69. Obuekwe, C. O.; Al-Jadi, Z. K.; Al-Saleh, E. S. Sequential hydrophobic partitioning of cells of *Pseudomonas aeruginosa* gives rise to variants of increasing cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *270*, 214–219, doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00685.x.

70. Weathers, T. S.; Higgins, C. P.; Sharp, J. O. Enhanced biofilm production by a toluene-degrading *Rhodococcus* observed after exposure to perfluoroalkyl acids. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 5458–5466, doi:10.1021/es5060034.

71. Pathak, M.; Devi, A.; Sarma, H. K.; Lal, B. Application of bioflocculating property of *Pseudomonas aeruginosa* strain IASST201 in treatment of oil-field formation water. *J. Basic Microbiol.* **2014**, *54*, 658–669, doi:10.1002/jobm.201301011.

72. Olivera, N. L.; Nievas, M. L.; Lozada, M.; del Prado, G.; Dionisi, H. M.; Siñeriz, F. Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. *Res. Microbiol.* **2009**, *160*, 19–26, doi:10.1016/J.RESMIC.2008.09.011.

73. Cameotra, S.; Singh, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microb. Cell Fact.* **2009**, *8*, 16, doi:10.1186/1475-2859-8-16.

74. Kobayashi, H.; Uematsu, K.; Hirayama, H.; Horikoshi, K. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 6451–5, doi:10.1128/jb.182.22.6451-6455.2000.

75. Meng, L.; Li, H.; Bao, M.; Sun, P. Metabolic pathway for a new strain P*seudomonas synxantha*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*.

76. Hua, F.; Wang, H. Selective pseudosolubilization capability of *Pseudomonas* sp. DG17 on n-alkanes and uptake mechanisms analysis. *Front. Environ. Sci. Eng.* **2013**, *7*, 539–551, doi:10.1007/s11783-013-0498-z.

77. Kim, I. S.; Foght, J. M.; Gray, M. R. Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+14He. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 650–659, doi:10.1002/bit.10421.

78. Southam, G.; Whitney, M.; Knickerbocker, C. Structural characterization of the hydrocarbon degrading bacteria–oil interface: implications for bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2001**, *47*, 197–201, doi:10.1016/S0964-8305(01)00051-8.

79. Hua, F.; Wang, H. Uptake modes of octadecane by *Pseudomonas* sp. DG17 and synthesis of biosurfactant. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 25–37, doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05178.x.

80. Neumann, G.; Veeranagouda, Y.; Karegoudar, T. B.; Sahin, O.; Mausezahl, I.; Kabelitz, N.; Kappelmeyer, U.; Heipieper, H. J. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles* **2005**, *9*, 163–168, doi:10.1007/s00792-005-0431-x.

81. Michael, E.; Nitzan, Y.; Langzam, Y.; Luboshits, G.; Cahan, R. Effect of toluene on *Pseudomonas stutzeri* ST-9 morphology — plasmolysis, cell size, and formation of outer membrane vesicles. *Can. J. Microbiol.* **2016**, *62*, 682–691, doi:10.1139/cjm-2016-0099.

82. Prabhu, Y.; Phale, P. S. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 342–351, doi:10.1007/s00253-002-1218-y.

83. Iraji, S.; Ayatollahi, S. Experimental investigation on asphaltene biodegradability using microorganism: cell surface properties' approach. *J. Pet. Explor. Prod. Technol.* **2019**, *9*, 1413–1422, doi:10.1007/s13202-018-0537-1.

84. Oberoi, A. S.; Philip, L. Variation in cell surface characteristics and extracellular polymeric substances during the biodegradation of monocyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons in single and multi-substrate systems. *Environ. Technol.* **2018**, *39*, 3115–3126, doi:10.1080/09593330.2017.1375019.

85. Zhang, J.; Sun, Z.; Li, Y.; Peng, X.; Li, W.; Yan, Y. Biodegradation of p-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *163*, 723–728, doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.018.

86. Kok Kee, W.; Hamzah, A. Comparative degradation between heavy and light crude oil mediated by nitrogen-induced cell-surface hydrophobicity. *Remediat. J.* **2018**, *28*, 37–43, doi:10.1002/rem.21574.

87. Kaczorek, E.; Sałek, K.; Guzik, U.; Dudzińska-Bajorek, B. Cell surface properties and fatty acids composition of *Stenotrophomonas maltophilia* under the influence of hydrophobic compounds and surfactants. *N. Biotechnol.* **2013**, *30*, 173–182, doi:10.1016/j.nbt.2012.09.003.

88. Jimoh, A. A.; Lin, J. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant producing *Paenibacillus* sp. D9 and its biodegradation of diesel fuel. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2019**, *16*, 4143–4158, doi:10.1007/s13762-019-02341-3.

89. Lan, G.; Fan, Q.; Liu, Y.; Liu, Y.; Liu, Y.; Yin, X.; Luo, M. Effects of the addition of waste cooking oil on heavy crude oil biodegradation and microbial enhanced oil recovery using *Pseudomonas* sp. SWP- 4. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *103*, 219–226, doi:10.1016/J.BEJ.2015.08.004.

90. Obuekwe, C. O.; Al-Jadi, Z. K.; Al-Saleh, E. S. Comparative hydrocarbon utilization by hydrophobic and hydrophilic variants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *105*, 1876–1887, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03887.x.

91. McBroom, A. J.; Kuehn, M. J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 545–558, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x.

92. Kaczorek, E.; Urbanowicz, M.; Olszanowski, A. The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *81*, 363–368, doi:10.1016/j.colsurfb.2010.07.039.

93. Chang, W.-N.; Liu, C.-W.; Liu, H.-S. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 955–962, doi:10.1016/J.PROCBIO.2009.04.014.

94. Mohanty, G.; Mukherji, S. Enhancement of NAPL bioavailability by induction of cell-surface hydrophobicity in *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *Indian J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 295–306.

95. Hernández, M.; Torre, R. M. Long-term influence of the presence of a non-aqueous phase on the cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas* in two-phase partitioning bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1573–1581, doi:10.1007/s00253-010-2975-7.

96. Mawad, A. M. M.; Hesham, A. E.-L.; Mostafa, Y. M.; Shoriet, A. Pyrene degrading *Achromobacter denitrificans* ASU-035: growth rate, enzymes activity, and cell surface properties. *Rend. Lincei* **2016**, *27*, 557–563, doi:10.1007/s12210-016-0521-y.

97. Górna, H.; Ławniczak, Ł.; Zgoła-Grześkowiak, A.; Kaczorek, E. Differences and dynamic changes in the cell surface properties of three Pseudomonas aeruginosa strains isolated from petroleum-polluted soil as a response to various carbon sources and the external addition of rhamnolipids. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102*, 3028–3033, doi:10.1016/j.biortech.2010.09.124.

98. Kaczorek, E.; Sałek, K.; Guzik, U.; Jesionowski, T.; Cybulski, Z. Biodegradation of alkyl derivatives of aromatic hydrocarbons and cell surface properties of a strain of *Pseudomonas stutzeri*. *Chemosphere* **2013**, *90*, 471–478.

99. Yalçin, E.; Cavuşoğlu, K.; Ozen, E. Hydrocarbon degradation by a new *Pseudomonas* sp. strain RW-II, with polycationic surfactant to modify the cell hydrophobicity. *Environ. Technol.* **2011**, *33*, 1743–1747.

100. Kaczorek, E.; Sałek, K.; Guzik, U.; Dudzińska-Bajorek, B.; Olszanowski, A. The impact of long-term contact of *Achromobacter* sp. 4(2010) with diesel oil – Changes in biodegradation, surface properties and hexadecane monooxygenase activity. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2013**, *78*, 7–16, doi:10.1016/j.ibiod.2012.12.003.

101. Rodrigues, A. C.; Wuertz, S.; Brito, A. G.; Melo, L. F. Fluorene and phenanthrene uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: Kinetics and physiological aspects. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *90*, 281–289, doi:10.1002/bit.20377.

102. Chang, W.-N.; Liu, C.-W.; Liu, H.-S. Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*. *Process Biochem.* **2009**, *44*, 955–962, doi:10.1016/j.procbio.2009.04.014.

103. Sayavedra-Soto, L. A.; Chang, W.-N.; Lin, T.-K.; Ho, C.-L.; Liu, H.-S. Alkane utilization by *Rhodococcus* strain NTU-1 alone and in its natural association with *Bacillus fusiformis* L-1 and *Ochrobactrum* sp. *Biotechnol. Prog.* **2008**, *22*, 1368–1373, doi:10.1021/bp060100u.

104. Pathak, M.; Devi, A.; Bhattacharyya, K. G.; Sarma, H. K.; Subudhi, S.; Lal, B. Production of a non-cytotoxic bioflocculant by a bacterium utilizing a petroleum hydrocarbon source and its application in heavy metal removal. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 66037–66046, doi:10.1039/C5RA08636A.

105. Burd, G.; Ward, O. P. Involvement of a surface-active high molecular weight factor in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas marginalis*. *Can. J. Microbiol.* **1996**, *42*, 791–797, doi:10.1139/m96-099.

106. Dobslaw, D.; Engesser, K.-H. Degradation of 2-chlorotoluene by *Rhodococcus* sp. OCT 10. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *98*, 2205–2214, doi:10.1007/s00253-011-3543-5.

107. Guzik, U.; Greń, I.; Wojcieszyńska, D.; Łabużek, S. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Brazilian J. Microbiol.* **2009**, *40*, 285–291, doi:10.1590/S1517-83822009000200014.

108. Rosenberg, M.; Gutnick, D.; Rosenberg, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **1980**, *9*, 29–33, doi:10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x.

109. Siwińska-Stefańska, K.; Krysztafkiewicz, A.; Jesionowski, T. Effect of inorganic oxides treatment on the titanium dioxide surface properties. *Physicochem. Probl. Miner. Process.* **2008**, *42*, 141–152.

110. Ambalam, P.; Kondepudi, K. K.; Nilsson, I.; Wadström, T.; Ljungh, Å. Bile stimulates cell surface hydrophobicity, Congo red binding and biofilm formation of *Lactobacillus* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, *333*, 10–19, doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02590.x.

111. Zhang, D.; Zhu, L.; Li, F. Influences and mechanisms of surfactants on pyrene biodegradation based on interactions of surfactant with a *Klebsiella oxytoca* strain. *Bioresour. Technol.* **2013**, *142*, 454–461, doi:10.1016/j.biortech.2013.05.077.

112. Wojcieszyńska, D.; Guzik, U.; Greń, I.; Perkosz, M.; Hupert-Kocurek, K. Induction of aromatic ring: cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 805–811, doi:10.1007/s11274-010-0520-6.

113. Sasser, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Tech. Note #101* **1990**.

114. Stanisz, A. *Przystępny kurs statystyki : z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny*; Stanisz, A., Ed.; 3rd ed.; StatSoft: Kraków, 2006; ISBN 8388724185.

115. Drancourt, M.; Bollet, C.; Carta, A.; Rousselier, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 925–932, doi:10.1099/00207713-51-3-925.

116. Towner, K. J. The genus *Acinetobacter*. In *The Prokaryotes*; Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., Eds.; Springer: New York, 1992; pp. 3137–3143.

117. Bleuven, C.; Landry, C. R. Molecular and cellular bases of adaptation to a changing environment in microorganisms. *Proceedings. Biol. Sci.* **2016**, *283*, 20161458, doi:10.1098/rspb.2016.1458.

118. Silva, T. P.; Gamalier, J. P.; Melo, R. C. N. TEM as an important tool to study aquatic microorganisms and their relationships with ecological processes. In *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*; Janecek, M., Kral, R., Eds.; InTech Open: Londyn, 2016.

119. Carvalho, C. C. C. R. de; Fonseca, M. M. R. da Principal component analysis applied to bacterial cell behaviour in the presence of organic solvents. *Biocatal. Biotransformation* **2004**, *22*, 203–214, doi:10.1080/10242420410001727346.

120. Kachlany, S. C.; Levery, S. B.; Kim, J. S.; Reuhs, B. L.; Lion, L. W.; Ghiorse, W. C. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 774–84.

121. Onbasli, D.; Aslim, B. Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas* spp. strains. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *168*, 64–67, doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.131.

122. Meng, L.; Li, H.; Bao, M.; Sun, P. Metabolic pathway for a new strain *Pseudomonas synxantha* LSH-7′: from chemotaxis to uptake of n-hexadecane. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39068, doi:10.1038/srep39068.

123. Heipieper, H. J.; Cornelissen, S.; Pepi, M. Surface properties and cellular energetics of bacteria in response to the presence of hydrocarbons. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*; Timmis, K. N., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2010; pp. 1615–1624.

124. Bouchez Naitali, M.; Rakatozafy, H.; Marchal, R.; Leveau, J. Y.; Vandecasteele, J. P. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 421–428, doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00678.x.

125. Giles, S. K.; Stroeher, U. H.; Eijkelkamp, B. A.; Brown, M. H. Identification of genes essential for pellicle formation in *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol.* **2015**, *15*, 116, doi:10.1186/s12866-015-0440-6.

126. Skerniškytė, J.; Krasauskas, R.; Péchoux, C.; Kulakauskas, S.; Armalytė, J.; Sužiedėlienė, E. Surface-related features and virulence among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates belonging to international clones I and II. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*, 3116, doi:10.3389/fmicb.2018.03116.

127. Fernandes, R. de C. R.; Borges, A. C.; Tótola, M. R. Dismistifying the involvement of cell surface hydrophobicity and biosurfactant production in W/O demulsification activity of bacteria. *N. Biotechnol.* **2012**, *29*, S78, doi:10.1016/j.nbt.2012.08.218.

128. Zdarta, A.; Smułek, W.; Trzcińska, A.; Cybulski, Z.; Kaczorek, E. Properties and potential application of efficient biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. KZ1 strain. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* **2019**, *54*, 110–117, doi:10.1080/10934529.2018.1530537.

129. van der Mei, H. C.; Cowan, M. M.; Busscher, H. J. Physicochemical and structural studies on *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 and MR-481—Two standard strains in hydrophobicity tests. *Curr. Microbiol.* **1991**, *23*, 337–341, doi:10.1007/BF02104136.

130. Wilson, W. W.; Wade, M. M.; Holman, S. C.; Champlin, F. R. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *J. Microbiol. Methods* **2001**, *43*, 153–164, doi:10.1016/S0167-7012(00)00224-4.

131. Abbasnezhad, H.; Gray, M. R.; Foght, J. M. Two different mechanisms for adhesion of Gram-negative bacterium, *Pseudomonas fluorescens* LP6a, to an oil–water interface. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *62*, 36–41, doi:10.1016/J.COLSURFB.2007.09.023.

132. Xie, B.; Gu, J.; Lu, J. Surface properties of bacteria from activated sludge in relation to bioflocculation. *J. Environ. Sci.* **2010**, *22*, 1840–1845, doi:10.1016/S1001-0742(09)60329-6.

133. Rickard, A. H.; Leach, S. A.; Buswell, C. M.; High, N. J.; Handley, P. S. Coaggregation between aquatic bacteria is mediated by specific-growth-phase-dependent lectin-saccharide interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 431–434, doi:10.1128/aem.66.1.431-434.2000.

134. Rickard, A. H.; Leach, S. A.; Hall, L. S.; Buswell, C. M.; High, N. J.; Handley, P. S. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3644–3650, doi:10.1128/aem.68.7.3644-3650.2002.

135. Watkinson, R. J.; Morgan, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* **1990**, *1*, 79–92, doi:10.1007/BF00058828.

136. Kłodzińska, E.; Szumski, M.; Dziubakiewicz, E.; Hrynkiewicz, K.; Skwarek, E.; Janusz, W.; Buszewski, B. Effect of zeta potential value on bacterial behavior during electrophoretic separation. *Electrophoresis* **2010**, *31*, 1590–1596, doi:10.1002/elps.200900559.

137. van den Berg, B. Going forward laterally: Transmembrane passage of hydrophobic molecules through protein channel walls. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1339–1343, doi:10.1002/cbic.201000105.

138. Hong, H.; Patel, D. R.; Tamm, L. K.; van den Berg, B. The outer membrane protein OmpW forms an eight-stranded β-barrel with a hydrophobic channel. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 7568–7577, doi:10.1074/jbc.M512365200.

139. Neher, T. M.; Lueking, D. R. *Pseudomonas fluorescens* ompW : plasmid localization and requirement for naphthalene uptake. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 553–563, doi:10.1139/W09-002.

140. Missner, A.; Pohl, P. 110 years of the Meyer-Overton rule: Predicting membrane permeability of gases and other small compounds. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1405–1414, doi:10.1002/cphc.200900270.

141. Cho, H. J.; Kim, K.; Sohn, S. Y.; Cho, H. Y.; Kim, K. J.; Kim, M. H.; Kim, D.; Kim, E.; Kang, B. S. Substrate binding mechanism of a type I extradiol dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 34643–34652, doi:10.1074/jbc.M110.130310.

142. Tani, A.; Ishige, T.; Sakai, Y.; Kato, N. Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1819–1823, doi:10.1128/JB.183.5.1819-1823.2001.

143. van Beilen, J. B.; Funhoff, E. G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 13–21, doi:10.1007/s00253-006-0748-0.

144. Lal, B.; Khanna, S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J. Appl. Bacteriol.* **1996**, *81*, 355–362.

145. Whyte, L. G.; Hawari, J.; Zhou, E.; Bourbonnière, L.; Inniss, W. E.; Greer, C. W. Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 2578–2584.

146. Mishra, S.; Singh, S. N. Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. *Bioresour. Technol.* **2012**, *111*, 148–154, doi:10.1016/j.biortech.2012.02.049.

147. Gurr, M. I.; Harwood, J. L. The nature of lipids and their place in living things. In *Lipid Biochemistry*; Springer US: Boston, MA, 1991; pp. 1–9.

148. Zhang, Y.-M.; Rock, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 222–233, doi:10.1038/nrmicro1839.

149. Mrozik, A.; Piotrowska-Seget, Z.; Łabuzek, S. Changes in whole cell-derived fatty acids induced by naphthalene in bacteria from genus *Pseudomonas*. *Microbiol. Res.* **2004**, doi:10.1016/j.micres.2004.02.001.

150. Mrozik, A.; Łabużek, S.; Piotrowska-Seget, Z. Changes in fatty acid composition in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri* during naphthalene degradation. *Microbiol. Res.* **2005**, *160*, 149–157, doi:10.1016/J.MICRES.2004.11.001.

151. Murínová, S.; Dercová, K. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. *Int. J. Microbiol.* **2014**, *2014*, 1–16, doi:10.1155/2014/873081.

152. Kallimanis, A.; Frillingos, S.; Drainas, C.; Koukkou, A. I. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 709–717, doi:10.1007/s00253-007-1036-3.

153. Weber, M. H. W.; Klein, W.; Müller, L.; Niess, U. M.; Marahiel, M. A. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol. Microbiol.* **2004**, *39*, 1321–1329, doi:10.1111/j.1365-2958.2001.02322.x.

154. Segura, A.; Duque, E.; Mosqueda, G.; Ramos, J. L.; Junker, F. Multiple responses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environ. Microbiol.* **1999**, *1*, 191–198.

155. De Carvalho, C. C. C. R.; Da Fonseca, M. M. R. Preventing biofilm formation: promoting cell separation with terpenes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2007**, *61*, 406–413, doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00352.x.

156. Heipieper, H. J.; Neumann, G.; Kabelitz, N.; Kastner, M.; Richnow, H. H. Carbon isotope fractionation during cis-trans isomerization of unsaturated fatty acids in Pseudomonas putida. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *66*, 285–290, doi:10.1007/s00253-004-1734-z.

157. Heipieper, H. J.; Meinhardt, F.; Segura, A. The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *229*, 1–7, doi:10.1016/S0378-1097(03)00792-4.

158. Junker, F.; Ramos, J. L. Involvement of the cis/trans isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 5693–5700.

159. Pinkart, H. C.; White, D. C. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 4219–4226, doi:10.1128/jb.179.13.4219-4226.1997.

160. Zhila, N.; Kalacheva, G.; Volova, T. Fatty acid composition and polyhydroxyalkanoates production by *Cupriavidus eutrophus* B-10646 cells grown on different carbon sources. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 69–78, doi:10.1016/J.PROCBIO.2014.10.018.

161. Ingram, L. O. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *33*, 1233–1236.

162. Mansilla, M. C.; Cybulski, L. E.; Albanesi, D.; de Mendoza, D. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 6681–8, doi:10.1128/JB.186.20.6681-6688.2004.

163. Smułek, W.; Zdarta, A.; Guzik, U.; Dudzińska-Bajorek, B.; Kaczorek, E. *Rahnella* sp. strain EK12: Cell surface properties and diesel oil biodegradation after long-term contact with natural surfactants and diesel oil. *Microbiol. Res.* **2015**, *176*, 38–47, doi:10.1016/j.micres.2015.04.008.

164. Kaneda, T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* **1991**, *55*, 288–302.

165. Pepi, M.; Heipieper, H. J.; Fischer, J.; Ruta, M.; Volterrani, M.; Focardi, S. E. Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp. ORAs2 and *Pseudomonas* sp. ORAs5 strains. *Extremophiles* **2008**, *12*, 343–349, doi:10.1007/s00792-008-0147-9.

166. Unell, M.; Kabelitz, N.; Jansson, J. K.; Heipieper, H. J. Adaptation of the psychrotroph *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 to growth temperature and the presence of phenols by changes in the anteiso/iso ratio of branched fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *266*, 138–143, doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00502.x.

167. Mrozik, A.; Cycoń, M.; Piotrowska-Seget, Z. Changes of FAME profiles as a marker of phenol degradation in different soils inoculated with *Pseudomonas* sp. CF600. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2010**, *64*, 86–96, doi:10.1016/j.ibiod.2009.11.002.

168. Certik, M.; Dercova, K.; Sejakova, Z.; Find'ova, M.; Jakubik, T. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) on the membrane lipids of bacterial cell. *Biologia (Bratisl).* **2003**, *58*, 1111–1117.

169. Zorádová, S.; Dudášová, H.; Lukáčová, L.; Dercová, K.; Čertík, M. The effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) on the membrane lipids of *Pseudomonas stutzeri*. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2011**, *65*, 1019–1023, doi:10.1016/J.IBIOD.2011.03.012.

170. Denich, T. J.; Beaudette, L. A.; Lee, H.; Trevors, J. T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Methods* **2003**, *52*, 149–182.

171. Grogan, D. W.; Cronan, J. E.; Jr Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 429–438.

172. Moorman, M. A.; Thelemann, C. A.; Zhou, S.; Pestka, J. J.; Linz, J. E.; Ryser, E. T. Altered hydrophobicity and membrane composition in stress-adapted *Listeria innocua*. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 182–185, doi:10.4315/0362-028X-71.1.182.

173. Guo, M. S.; Gross, C. A. Stress-induced remodeling of the bacterial proteome. *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R424-R434, doi:10.1016/j.cub.2014.03.023.

174. Krell, T.; Lacal, J.; Guazzaroni, M. E.; Busch, A.; Silva-Jiménez, H.; Fillet, S.; Reyes-Darías, J. A.; Muñoz-Martínez, F.; Rico-Jiménez, M.; García-Fontana, C.; Duque, E.; Segura, A.; Ramos, J. L. Responses of *Pseudomonas putida* to toxic aromatic carbon sources. *J. Biotechnol.* **2012**, doi:10.1016/j.jbiotec.2012.01.026.

175. Domínguez-Cuevas, P.; González-Pastor, J.-E.; Marqués, S.; Ramos, J.-L.; de Lorenzo, V. Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11981–11991, doi:10.1074/jbc.M509848200.

176. Mecsas, J.; Rouviere, P. E.; Erickson, J. W.; Donohue, T. J.; Gross, C. A. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **1993**, *7*, 2618–2628, doi:10.1101/gad.7.12b.2618.

177. De Las Peñas, A.; Connolly, L.; Gross, C. A. The σ^E-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of σ^E. *Mol. Microbiol.* **1997**, *24*, 373–385, doi:10.1046/j.1365-2958.1997.3611718.x.

178. Testerman, T. L.; Vazquez-Torres, A.; Xu, Y.; Jones-Carson, J.; Libby, S. J.; Fang, F. C. The alternative sigma factor σ^E controls antioxidant defences required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 771–782, doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02787.x.

179. Burgess, R. R. Sigma Factors. In *Encyclopedia of Genetics*; Brenner, S., Miller, J. H., Eds.; Academic Press, 2001; pp. 1831–1834, ISBN 9780122270802.

180. Alba, B. M.; Gross, C. A. Regulation of the *Escherichia coli* σ^E-dependent envelope stress response. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 613–619, doi:10.1111/j.1365-2958.2003.03982.x.

181. Morimoto, H.; Kuwano, M.; Kasahara, Y. Gene expression profiling of *Pseudomonas putida* F1 after exposure to aromatic hydrocarbon in soil by using proteome analysis. *Arch. Microbiol.* **2013**, *195*, 805–813, doi:10.1007/s00203-013-0932-4.

182. Ramos-González, M.-I.; Olson, M.; Gatenby, A. A.; Mosqueda, G.; Manzanera, M.; Campos, M. J.; Víchez, S.; Ramos, J. L. Cross-regulation between a novel two-component signal transduction system for catabolism of toluene in *Pseudomonas mendocina* and the TodST system from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 7062–7, doi:10.1128/jb.184.24.7062-7067.2002.

183. Morlett-Chavez, J. A.; Ascacio-Martinez, J. A.; Haskins, W. E.; Acuña-Askar, K.; Barrera-Saldaña, H. A. Gene expression during BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and a *Pseudomonas putida* strain (HM346961) isolated from it. *Polish J. Microbiol.* **2017**, *66*, 189–199.

184. Koh, S.; Hwang, J.; Guchhait, K.; Lee, E.-G.; Kim, S.-Y.; Kim, S.; Lee, S.; Chung, J. M.; Jung, H. S.; Lee, S. J.; Ryu, C.-M.; Lee, S.-G.; Oh, T.-K.; Kwon, O.; Kim, M. H. Molecular insights into toluene sensing in the TodS/TodT signal transduction system. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 8575–90, doi:10.1074/jbc.M116.718841.

185. Kasai, Y.; Inoue, J.; Harayama, S. The TOL plasmid pWW0 xylN gene product from *Pseudomonas putida* is involved in m-xylene uptake. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 6662–6666, doi:10.1128/JB.183.22.6662-6666.2001.

186. Porankiewicz, J.; Wang, J.; Clarke, A. K. New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microbiol.* **1999**, *32*, 449–458, doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01357.x.

187. Barabás, G.; Vargha, G.; Szabó, I. M.; Penyige, A.; Damjanovich, S.; Szöllösi, J.; Matkó, J.; Hirano, T.; Mátyus, A.; Szabó, I. N-Alkane uptake and utilisation by *Streptomyces strains*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2001**, *79*, 269–276.

188. Mukherjee, A. K.; Bhagowati, P.; Biswa, B. B.; Chandra, A.; Kalita, B. A comparative intracellular proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* strain ASP-53 grown on pyrene or glucose as sole source of carbon and identification of some key enzymes of pyrene biodegradation pathway. *J. Proteomics* **2017**, *167*, 25–35, doi:10.1016/J.JPROT.2017.07.020.

189. Wei, K.; Yin, H.; Peng, H.; Liu, Z.; Lu, G.; Dang, Z. Characteristics and proteomic analysis of pyrene degradation by *Brevibacillus brevis* in liquid medium. *Chemosphere* **2017**, *178*, 80–87, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.03.049.

190. Efremenko, E. N.; Azizov, R. E.; Raeva, A. A.; Abbasov, V. M.; Varfolomeyev, S. D. An approach to the rapid control of oil spill bioremediation by bioluminescent method of intracellular ATP determination. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2005**, *56*, 94–100, doi:10.1016/J.IBIOD.2005.06.004.

191. Ramos, J.-L.; Sol Cuenca, M.; Molina-Santiago, C.; Segura, A.; Duque, E.; Gómez-García, M. R.; Udaondo, Z.; Roca, A. Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39*, 555–566, doi:10.1093/femsre/fuv006.

192. Alsaker, K. V; Spitzer, T. R.; Papoutsakis, E. T. Transcriptional analysis of spo0A overexpression in Clostridium acetobutylicum and its effect on the cell's response to butanol stress. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1959–71, doi:10.1128/jb.186.7.1959-1971.2004.

193. Zhu, L.; Dong, H.; Zhang, Y.; Li, Y. Engineering the robustness of *Clostridium acetobutylicum* by introducing glutathione biosynthetic capability. *Metab. Eng.* **2011**, *13*, 426–434, doi:10.1016/j.ymben.2011.01.009.

194. Rutherford, B. J.; Dahl, R. H.; Price, R. E.; Szmidt, H. L.; Benke, P. I.; Mukhopadhyay, A.; Keasling, J. D. Functional Genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 1935–1945, doi:10.1128/AEM.02323-09.

195. Molina-Santiago, C.; Udaondo, Z.; Gómez-Lozano, M.; Molin, S.; Ramos, J.-L. Global transcriptional response of solvent-sensitive and solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strains exposed to toluene. *Environ. Microbiol.* **2016**, doi:10.1111/1462-2920.13585.

196. Song, R.; Hua, Z.; Li, H.; Chen, J. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by two *Pseudomonas aeruginosa* strains with different uptake modes. *J. Environ. Sci. Heal. Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **2006**, *41*, 733–748, doi:10.1080/10934520600575135.

197. Fida, T. T.; Moreno-Forero, S. K.; Breugelmans, P.; Heipieper, H. J.; Röling, W. F. M.; Springael, D. Physiological and transcriptome response of the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Novosphingobium* sp. LH128 after inoculation in soil. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 1570–1579, doi:10.1021/acs.est.6b03822.

198. Khodaei, K.; Nassery, H. R.; Asadi, M. M.; Mohammadzadeh, H.; Mahmoodlu, M. G. BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2017**, *116*, 234–242, doi:10.1016/j.ibiod.2016.11.001.

199. Ljević, M.; Gojgić-Cvijović, G.; Ieda, T.; Hashimoto, S.; Nakano, T.; Bulatović, S.; Ilić, M.; Beškoski, V. Biodegradation of the aromatic fraction from petroleum diesel fuel by *Oerskovia* sp. followed by comprehensive GC×GC-TOF MS. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *363*, 227–232, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2018.10.005.

200. Zhang, L.; Zhang, C.; Cheng, Z.; Yao, Y.; Chen, J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* by f-4. *Chemosphere* **2013**, *90*, 1340–1347, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.06.043.

201. Mamma, D.; Kalogeris, E.; Papadopoulos, N.; Hatzinikolaou, D. G.; Christrakopoulos, P.; Kekos, D. Biodegradation of phenol by acclimatized *Pseudomonas putida* cells using glucose as an added growth substrate. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **2004**, *39*, 2093–2104.

202. Subashchandrabose, S. R.; Venkateswarlu, K.; Naidu, R.; Megharaj, M. Biodegradation of high-molecular weight PAHs by *Rhodococcus wratislaviensis* strain 9: overexpression of amidohydrolase induced by pyrene and BaP. *Sci. Total Environ.* **2018**, *651*, 813–821, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.192.

203. Nojiri, H.; Shintani, M.; Omori, T. Divergence of mobile genetic elements involved in the distribution of xenobiotic-catabolic capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64*, 154–174, doi:10.1007/s00253-003-1509-y.

204. Galvão, T. C.; Mohn, W. W.; de Lorenzo, V. Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 497–506, doi:10.1016/J.TIBTECH.2005.08.002.

205. Devpura, N.; Jain, K.; Patel, A.; Joshi, C. G.; Madamwar, D. Metabolic potential and taxonomic assessment of bacterial community of an environment to chronic industrial discharge. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2017**, *123*, 216–227, doi:10.1016/J.IBIOD.2017.06.011.

206. Lenchi, N.; İnceoğlu, Ö.; Kebbouche-Gana, S.; Gana, M. L.; Llirós, M.; Servais, P.; García-Armisen, T. Diversity of microbial communities in production and injection waters of Algerian oil fields revealed by 16S rRNA gene amplicon 454 pyrosequencing. *PLoS One* **2013**, *8*, e66588, doi:10.1371/journal.pone.0066588.

207. Sutton, N. B.; Maphosa, F.; Morillo, J. A.; Abu Al-Soud, W.; Langenhoff, A. A. M.; Grotenhuis, T.; Rijnaarts, H. H. M.; Smidt, H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 619–30, doi:10.1128/AEM.02747-12.

208. Wang, L.-Y.; Ke, W.-J.; Sun, X.-B.; Liu, J.-F.; Gu, J.-D.; Mu, B.-Z. Comparison of bacterial community in aqueous and oil phases of water-flooded petroleum reservoirs using pyrosequencing and clone library approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 4209–4221, doi:10.1007/s00253-013-5472-y.

209. Abbai, N. S.; Pillay, B. Analysis of hydrocarbon-contaminated groundwater metagenomes as revealed by high-throughput sequencing. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *54*, 900–912, doi:10.1007/s12033-012-9639-z.

SPIS TABEL I RYSUNKÓW

TABELA I. 1. WYKAZ DOPUSZCZALNYCH NORM ZAWARTOŚCI WĘGLOWODORÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROPY NAFTOWEJ NA TERENACH UŻYTKOWANYCH MIESZKANIOWO W POLSCE, WIELKIEJ BRYTANII, HOLANDII, NIEMCZECH, NOWEJ ZELANDII I KANADZIE 15

TABELA I. 2. PRZYKŁADY WYKORZYSTANIA BIOAUGMENTACJI DO USUWANIA ZANIECZYSZCZEŃ WĘGLOWODOROWYCH Z RÓŻNYCH ŚRODOWISK 25

TABELA I. 3. ZMIANY WYBRANYCH WŁAŚCIWOŚCI MIKROORGANIZMÓW POD WPŁYWEM KONTAKTU Z WĘGLOWODORAMI 35

TABELA II. 1. SPIS ODCZYNNIKÓW WYKORZYSTYWANYCH DO BADAŃ 43

TABELA II. 2. SPIS APARATURY I SPRZĘTU WYKORZYSTYWANYCH DO BADAŃ 45

TABELA II. 3. SKŁAD MEDIUM HODOWLANEGO 46

TABELA II. 4. SKŁAD ROZTWORU MIKROELEMENTÓW 46

TABELA II. 5. SKŁAD ROZTWORÓW WYKORZYSTYWANYCH DO DERYWATYZACJI BAKTERYJNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH 58

TABELA II. 6. SEKWENCJE WYBRANYCH STARTERÓW WYKORZYSTANYCH W REAKCJI LOSOWEJ AMPLIFIKACJI POLIMORFICZNYCH FRAGMENTÓW DNA 62

TABELA III. 1. WYNIKI IDENTYFIKACJI GENETYCZNEJ, NUMERY W BAZIE GENBANK ORAZ POCHODZENIE PRÓBEK, Z KTÓRYCH WYIZOLOWANO MIKROORGANIZMY 69

TABELA III. 2. GŁÓWNE RÓŻNICE BIOCHEMICZNE POMIĘDZY SZCZEPAMI *R. PLANTICOLA* M01, *R. ORNITHINOLYTICA* M03 *I A. CALCOACETICUS* M1B 70

TABELA III. 3. WARTOŚCI HYDROFOBOWOŚCI POWIERZCHNI KOMÓREK W PRÓBIE KONTROLNEJ ORAZ PO 12 MIESIĄCACH HODOWLI NA PODŁOŻACH SELEKTYWNYCH 75

TABELA III. 4. WARTOŚCI POTENCJAŁU ELEKTROKINETYCZNEGO KOMÓREK W PRÓBIE KONTROLNEJ ORAZ PO 12 MIESIĄCACH HODOWLI NA PODŁOŻACH SELEKTYWNYCH 76

TABELA III. 5. WARTOŚCI INDEKSU POLIDYSPERSYJNOŚCI BADANYCH PRÓBEK (PRÓBA KONTROLNA ORAZ PO 12-MIESIĘCZNEJ HODOWLI NA PODŁOŻACH SELEKTYWNYCH) 78

TABELA III. 6. WARTOŚCI STĘŻEŃ CAŁKOWITEJ WYIZOLOWANEJ FRAKCJI BIAŁKOWEJ Z KOMÓREK BADANYCH SZCZEPÓW HODOWANYCH NA RÓŻNYCH PODŁOŻACH, SZCZEPÓW *R. PLANTICOLA* (M01), *R. ORNITHINOLYTICA* (M03) ORAZ *A. CALCOACETICUS* (M1B) 81

TABELA III. 7. PROCENTOWY UDZIAŁ WYSZCZEGÓLNIONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH PO 12 MIESIĄCACH EKSPOZYCJI W STRUKTURZE BŁONY KOMÓRKOWEJ BAKTERII Z PRÓBY KONTROLNEJ (HODOWANYCH NA GLUKOZIE) ORAZ EKSPONOWANYCH NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE SZCZEPÓW *R. PLANTICOLA* (M01), *R. ORNITHINOLYTICA* (M03) ORAZ *A. CALCOACETICUS* (M1B) 92

TABELA III. 8. OZNACZENIE, LOKALIZACJA MIEJSCA POBORU PRÓBEK ORAZ PARAMETRY CHARAKTERYZUJĄCE WYKORZYSTANE W BADANIACH PRÓBKI WODY JEZIORNEJ 120

TABELA IV. 1. . GŁÓWNE WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK ANALIZOWANYCH SZCZEPÓW ORAZ EFEKTYWNOŚĆ PRZEPROWADZANYCH PRZEZ NIE PROCESÓW BIODEGRADACJI WĘGLOWODORÓW 131

RYSUNEK I. 1. SCHEMAT PODZIAŁU WĘGLOWODORÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROPY NAFTOWEJ (NA PODSTAWIE [7-11]) 12
RYSUNEK I. 2. SCHEMAT MIGRACJI ZANIECZYSZCZEŃ WĘGLOWODOROWYCH W ŚRODOWISKU (NA PODSTAWIE [4]) 13
RYSUNEK I. 3. CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WYBÓR OPTYMALNEJ METODY USUWANIA ZANIECZYSZCZEŃ NA DANYM TERENIE (NA PODSTAWIE [16,25, 26]) 16
RYSUNEK I. 4. BIODOSTĘPNOŚĆ ZANIECZYSZCZEŃ DLA MIKROORGANIZMÓW (NA PODSTAWIE [33-35]) 20
RYSUNEK I. 5. CZYNNIKI MOGĄCE WYWOŁYWAĆ STRES U MIKROORGANIZMÓW 28
RYSUNEK I. 6. GŁÓWNE SZLAKI DEGRADACJI WĘGLOWODORÓW ALIFATYCZNYCH I AROMATYCZNYCH W KOMÓRKACH MIKROORGANIZMÓW (NA PODSTAWIE [66]) 31

RYSUNEK II. 1. SCHEMAT PROCESU IZOLACJI I CHARAKTERYSTYKI MIKROORGANIZMÓW Z PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH 49
RYSUNEK II. 2. SCHEMAT PRZEPROWADZONYCH ANALIZ W CELU IDENTYFIKACJI WYWOŁANYCH EKSPOZYCJĄ NA WĘGLOWODORY ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK, GDZIE: ON – OLEJ NAPĘDOWY 53
RYSUNEK II. 3. SCHEMAT REAKCJI *B*-GALAKTOZYDAZY Z ONPG 56
RYSUNEK II. 4. SCHEMAT HODOWLI BAKTERYJNYCH I SZCZEGÓŁOWYCH ANALIZ MODYFIKACJI KOMÓREK EKSPONOWANYCH NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE 60

RYSUNEK III. 1. DRZEWA POKREWIEŃSTWA FILOGENETYCZNEGO SKONSTRUOWANE DLA WYIZOLOWANYCH MIKROORGANIZMÓW NA PODSTAWIE BAZY NCBI: *R. PLANTICOLA* M01 (A); *R. ORNITHINOLYTICA* M03 (B); *A. CALCOACETICUS* M1B (C) 68
RYSUNEK III. 2. ZDJĘCIA KOMÓREK NIEEKSPONOWANYCH I EKSPONOWANYCH NA ZANIECZYSZCZENIA WĘGLOWODOROWE SZCZEPÓW *R. PLANTICOLA* M01 (A-D); *R. ORNITHINOLYTICA* M03 (E-H) ORAZ *A. CALCOACETICUS* M1B (I-L) 72
RYSUNEK III. 3. WARTOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ ADHEZJI KOMÓREK DO WĘGLOWODORÓW SZCZEPÓW: *R. PLANTICOLA* M01 (A); *R. ORNITHINOLYTICA* M03 (B) ORAZ *A. CALCOACETICUS* M1B (C) 75
RYSUNEK III. 4. WARTOŚCI POTENCJAŁU ELEKTROKINETYCZNEGO POWIERZCHNI KOMÓREK SZCZEPÓW: *R. PLANTICOLA* M01 (A); *R. ORNITHINOLYTICA* M03 (B) ORAZ *A. CALCOACETICUS* M1B (C) 76
RYSUNEK III. 5. WYKRESY PRZEDSTAWIAJĄCE WYNIKI POMIARÓW ŚREDNICY CZĄSTEK W PRÓBKACH SZCZEPÓW *R. PLANTICOLA* M01, *R. ORNITHINOLYTICA* M03 I *A. CALCOACETICUS* M1B W ZALEŻNOŚCI OD INTENSYWNOŚCI ROZPRASZANEGO ŚWIATŁA 78
RYSUNEK III. 6. WYKRES PRZEDSTAWIAJĄCY WYNIKI POMIARÓW WEWNĘTRZNEJ ORAZ CAŁKOWITEJ PRZEPUSZCZALNOŚCI BŁONY KOMÓRKOWEJ DLA BADANYCH SZCZEPÓW *R. PLANTICOLA* (M01), *R. ORNITHINOLYTICA* (M03) ORAZ *A. CALCOACETICUS* (M1B), HODOWANYCH NA PODŁOŻACH Z DODATKIEM: GLUKOZY (K), WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH (AR), WĘGLOWODORÓW ALIFATYCZNYCH (AL.) LUB OLEJU NAPĘDOWEGO (ON) 79
RYSUNEK III. 7. AKTYWNOŚĆ DIOKSYGENAZ KATECHOLOWYCH W KOMÓRKACH SZCZEPÓW WZRASTAJĄYCH NA PODŁOŻU ZAWIERAJĄCYM GLUKOZĘ (G) LUB EKSPONOWANYCH NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE (AR), ALIFATYCZNE (AL) LUB OLEJ NAPĘDOWY (ON): *R. PLANCTICOLA* (M01), *R. ORNITHINOLYTICA* (M03) ORAZ *A. CALCOACETICUS* (M1B) 81
RYSUNEK III. 8. AKTYWNOŚĆ TRANSFERAZY GLUTATIONOWEJ (GST) W KOMÓRKACH SZCZEPÓW WZRASTAJĄYCH NA PODŁOŻU ZAWIERAJĄCYM GLUKOZĘ (G) LUB EKSPONOWANYCH NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE (AR), ALIFATYCZNE (AL) LUB OLEJ NAPĘDOWY (ON): *R. PLANCTICOLA* (M01), *R. ORNITHINOLYTICA* (M03) ORAZ *A. CALCOACETICUS* (M1B) 81

RYSUNEK III. 9. WYKRES TYPU HEAT MAP, PRZEDSTAWIAJĄCY WYNIKI HIERARCHICZNEGO KLASTERINGU BIAŁEK WYIZOLOWANYCH Z KOMÓREK SZCZEPU *R. PLANTICOLA* M01. OZNACZENIE PRÓBEK: (1) BAKTERIE HODOWLANE NA PODŁOŻU Z DODATKIEM GLUKOZY; (2), BAKTERIE HODOWLANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA PODŁOŻU Z DODATKIEM GLUKOZY I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH NA 7 DNI; (3) BAKTERIE HODOWANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA PODŁOŻU Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH I PRZENIESIONE NA 7 DNI NA PODŁOŻE DODATKIEM GLUKOZY; (4) BAKTERIE HODOWANE NA PODŁOŻU Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH..... 94

RYSUNEK III. 10. WYKRES TYPU HEAT MAP, PRZEDSTAWIAJĄCY WYNIKI HIERARCHICZNEGO KLASTERINGU BIAŁEK WYIZOLOWANYCH Z KOMÓREK SZCZEPU *R. ORNITHINOLYTICA* M03. OZNACZENIE PRÓBEK: (1) BAKTERIE HODOWANE NA PODŁOŻU Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH (2) BAKTERIE HODOWLANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA PODŁOŻU Z DODATKIEM GLUKOZY I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH NA 7 DNI; (3) BAKTERIE HODOWANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA PODŁOŻU Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH I PRZENIESIONE NA 7 DNI NA PODŁOŻE DODATKIEM GLUKOZY; (4) BAKTERIE HODOWLANE NA PODŁOŻU Z DODATKIEM GLUKOZY..... 94

RYSUNEK III. 11. WYKRES TYPU HEAT MAP, PRZEDSTAWIAJĄCY WYNIKI HIERARCHICZNEGO KLASTERINGU BIAŁEK WYIZOLOWANYCH Z KOMÓREK SZCZEPU *A. CALCOACETICUS* M1B. OZNACZENIE PRÓBEK: (1) BAKTERIE HODOWLANE NA PODŁOŻU Z DODATKIEM GLUKOZY; (2),BAKTERIE HODOWLANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA PODŁOŻU Z DODATKIEM GLUKOZY I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH NA 7 DNI; (3) BAKTERIE HODOWANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA PODŁOŻU Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH I PRZENIESIONE NA 7 DNI NA PODŁOŻE DODATKIEM GLUKOZY; (4) BAKTERIE HODOWANE NA PODŁOŻU Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH..... 95

RYSUNEK III. 12. POZIOMY AKUMULACJI WYBRANYCH BIAŁEK, WYIZOLOWANYCH Z KOMÓREK SZCZEPU *R. PLANTICOLA* M01, GDZIE: G->G – KOMÓRKI UTRZYMYWANE STALE NA PODŁOŻU Z GLUKOZĄ; A->A – KOMÓRKI UTRZYMYWANE STALE NA PODŁOŻU Z WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI; A->G – KOMÓRKI EKSPONOWANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA WĘGLOWODORY AROMATYCNZE I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z GLUKOZĄ NA 7 DNI; G->A – KOMÓRKI UTRZYMYWANE NA PODŁOŻU Z GLUKOZĄ PRZEZ 12 MIESIĘCY I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z DODOATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH NA 7 DNI 96

RYSUNEK III. 13. POZIOMY AKUMULACJI WYBRANYCH BIAŁEK, WYIZOLOWANYCH Z KOMÓREK SZCZEPU *R. ORNITHINOLYTICA* M03, GDZIE: G->G – KOMÓRKI UTRZYMYWANE STALE NA PODŁOŻU Z GLUKOZĄ; A->A – KOMÓRKI UTRZYMYWANE STALE NA PODŁOŻU Z WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI; A->G – KOMÓRKI EKSPONOWANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA WĘGLOWODORY AROMATYCNZE I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z GLUKOZĄ NA 7 DNI; G->A – KOMÓRKI UTRZYMYWANE NA PODŁOŻU Z GLUKOZĄ PRZEZ 12 MIESIĘCY I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z DODOATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH NA 7 DNI 97

RYSUNEK III. 14. POZIOMY AKUMULACJI WYBRANYCH BIAŁEK, WYIZOLOWANYCH Z KOMÓREK SZCZEPU *A. CALCOACETICUS* M1B, GDZIE: G->G – KOMÓRKI UTRZYMYWANE STALE NA PODŁOŻU Z GLUKOZĄ; A->A – KOMÓRKI UTRZYMYWANE STALE NA PODŁOŻU Z WĘGLOWODORAMI AROMATYCZNYMI; A->G – KOMÓRKI EKSPONOWANE PRZEZ 12 MIESIĘCY NA WĘGLOWODORY AROMATYCNZE I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z GLUKOZĄ NA 7 DNI; G->A – KOMÓRKI UTRZYMYWANE NA PODŁOŻU Z GLUKOZĄ PRZEZ 12 MIESIĘCY I PRZENIESIONE NA PODŁOŻE Z DODOATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH NA 7 DNI 98

RYSUNEK III. 15. ZDJĘCIE ŻELU PO ROZDZIALE ELEKTROFORETYCZNYM PRODUKTÓW REAKCJI PCR UZYSKANYCH W WYNIKU AMPLIFIKACJI DNA WYIZOLOWANEGO ZE SZCZEPÓW: *R. PLANTICOLA* M01, *R. ORNITHINOLYTICA* M03 ORAZ *A. CALCOACETICUS* M1B, ZE STARTERAMI A2, A3, A4, A9, GDZIE: M – MARKER WIELKOŚCI DNA; M01, M03, M1B – ODPOWIEDNIE SZCZEPY MIKROORGANIZMÓW; NE – LINIA UTRZYMYWANA NA PODŁOŻU Z DODATKIEM GLUKOZY; E – LINIA UTRZYMYWANA NA PODŁOŻU Z DODATKIEM WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH..... 100

RYSUNEK III. 16. BIODEGRADACJA WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH, ALIFATYCZNYCH LUB OLEJU NAPĘDOWEGO PRZEZ BADANE SZCZEPY PO 7 ORAZ 14 DNIACH. LITERY NA WYKRESACH OZNACZAJĄ POSZCZEGÓLNE WĘGLOWODORY: KSYLEN (XY), PROPYLOBENZEN (PB), *TERT*-BUTYLOBENZEN (TB), *SEC*-BUTYLOBENZEN (SB), BUTYLOBENZEN (BB), NONAN (NN), DODEKAN (DD), TRIDEKAN (TD), HEKSADEKAN (HD) 109

RYSUNEK III. 17. BIODEGRADACJA WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH, ALIFATYCZNYCH LUB OLEJU NAPĘDOWEGO PRZEZ BADANE SZCZEPY EKSPONOWANE NA WĘGLOWOODRY AROMATYCZNE PO 7 ORAZ 14 DNIACH. LITERY NA WYKRESACH OZNACZAJĄ POSZCZEGÓLNE WĘGLOWODORY: KSYLEN (XY), PROPYLOBENZEN (PB), TERT-BUTYLOBENZEN (TB), SEC-BUTYLOBENZEN (SB), BUTYLOBENZEN (BB), NONAN (NN), DODEKAN (DD), TRIDEKAN (TD), HEKSADEKAN (HD) 112

RYSUNEK III. 18. BIODEGRADACJA WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH, ALIFATYCZNYCH LUB OLEJU NAPĘDOWEGO PRZEZ BADANE SZCZEPY EKSPONOWANE NA WĘGLOWODORY ALIFATYCZNE PO 7 ORAZ 14 DNIACH. LITERY NA WYKRESACH OZNACZAJĄ POSZCZEGÓLNE WĘGLOWODORY: KSYLEN (XY), PROPYLOBENZEN (PB), TERT-BUTYLOBENZEN (TB), SEC-BUTYLOBENZEN (SB), BUTYLOBENZEN (BB), NONAN (NN), DODEKAN (DD), TRIDEKAN (TD), HEKSADEKAN (HD) 114

RYSUNEK III. 19. BIODEGRADACJA WĘGLOWODORÓW AROMATYCZNYCH, ALIFATYCZNYCH LUB OLEJU NAPĘDOWEGO PRZEZ BADANE SZCZEPY EKSPONOWANE NA OLEJ NAĘDOWY PO 7 ORAZ 14 DNIACH. LITERY NA WYKRESACH OZNACZAJĄ POSZCZEGÓLNE WĘGLOWODORY: KSYLEN (XY), PROPYLOBENZEN (PB), TERT-BUTYLOBENZEN (TB), SEC-BUTYLOBENZEN (SB), BUTYLOBENZEN (BB), NONAN (NN), DODEKAN (DD), TRIDEKAN (TD), HEKSADEKAN (HD)..... 116

RYSUNEK III. 20. WYNIKI POMIARÓW ILOŚCIOWYCH NIEZDEGRADOWANEJ FRAKCJI OLEJU NAPĘDOWEGO W PRÓBACH BIODEGRADACYJNYCH PROWADZONYCH PRZEZ 7 LUB 14 DNI W UKŁADACH ZAWIERAJĄCYCH: WODĘ JEZIORNĄ 1 (W1) LUB WODĘ JEZIORNĄ 2 (W2), WODĘ BIOAUGMENTOWANĄ SZCZEPAMI NIEEKSPONOWANYMI (+NE) LUB SZCZEPAMI EKSPONOWANYMI NA WYBRANE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE ALIFATYCZNE I OLEJ NAPĘDOWY (+E) 121

RYSUNEK III. 21. WZGLĘDNA LICZEBNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW OKREŚLOANNA PODSTAWIE ANALIZY METGENOMU PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH POBRANYCH ZE ZBIORNIKA SŁODKOWODNEGO W DRAWSKIM PARKU NARODOWYM PRZED BIOAUGMENTACJĄ, 60 DNI PO BIOIAUGMENTACJI KONSORCJUM MIKROORGANIZMÓW NIEEKSPONOWANYCH LUB 60 DNI PO BIOAUGMENTACJI KONSORCJUM MIKROORGANIZMÓW PODDANYCH 12 MIESIĘCZNEJ EKSPOZYCJI NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE, ALIFATYCZNE LUB OLEJ NAPĘDOWY 123

RYSUNEK III. 22. WZGLĘDNA LICZEBNOŚĆ MIKROORGANIZMÓW OKREŚLONA NA PODSTAWIE ANALIZY METAGENOMU PRÓBEK ŚRODOWISKOWYCH Z UWZGLĘDNIENIEM RÓŻNYCH POZIOMÓW TAKSONOMICZNYCH. WODA POBRANA Z JEZIORA KIERSKIEGO (W2) PRZED BIOAUGMENTACJĄ, 60 DNI PO BIOAUGMENTACJI KONSORCJUM MIKROORGANIZMÓW PODDANYCH 12-MIESIĘCZNEJ EKSPOZYCJI NA WĘGLOWODORY AROMATYCZNE, ALIFATYCZNE LUB OLEJ NAPĘDOWY..... 126

DOROBEK NAUKOWY AUTORA

Wykaz dorobku naukowego (w latach 2015-2019)

Publikacje z listy JCR:

1. FISH and array CGH characterization of de novo derivative Y chromosome (Yq duplication and partial Yp deletion) in an azoospermic male (2015), *Reproductive BioMedicine Online*, DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.04.014, autorzy: E. Wiland, A. N. Yatsenko, A. Kishore, H. Stanczak, **A. Zdarta**, M. Ligaj, M. Olszewska, J. K. Wolski, M. Kurpisz, IF: 2,930
2. *Rahnella* sp. strain EK12: Cell surface properties and diesel oil biodegradation after long-term contact with natural surfactants and diesel oil (2015), *Microbiological Research* 176:38-47, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, U. Guzik, B. Dudzińska-Bajorek, E. Kaczorek, IF: 3,701
3. Alkyl polyglucosides as cell surface modification factors : Influence of the alkyl chain length (2015), *Toxicological and Environmental Chemistry* 98(1):13-25, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, M. Milewska, E. Kaczorek, IF: 0.972
4. *Sapindus* saponins impact on hydrocarbons biodegradation by bacteria strains after short and long term contact with pollutant (2016), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 142:207–213, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, M. Łuczak, P. Krawczyk, T. Jesionowski, E. Kaczorek, IF: 3,973
5. Influence of saponins on the biodegradation of halogenated phenols (2016), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131:127-134, autorzy: E. Kaczorek, W. Smułek, **A. Zdarta**, A. Sawczuk, A. Zgoła-Grześkowiak, IF: 4,527
6. Hydrocarbons biodegradation by activated sludge bacteria in the presence of natural and synthetic surfactants (2016), *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 17:1–7, autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, E. Pietraszak, E. Kaczorek, A. Olszanowski, IF: 1,536
7. *Saponaria officinalis L.* extract: Surface active properties and impact on environmental bacterial strains (2017), *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109:209–215, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, A. Pacholak, A. Zgoła-Grześkowiak, Ł. Marczak, M. Jarzębski, E. Kaczorek, IF: 3,973

8. Hydrocarbon-induced changes in proteins and fatty acids profiles of *Raoultella ornithinolytica* M03 (2017), *Journal of Proteomics*, 164:43–51, autorzy: **A. Zdarta**, J. Tracz, M. Łuczak, U. Guzik, E. Kaczorek, IF: 3,537
9. Impact of potent bioremediation enhancing plant extracts on *Raoultella ornithinolytica* properties (2017), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145:274–282, autorzy: **A. Zdarta**, B. Dudzińska-Bajorek, A. Nowak, U. Guzik, E. Kaczorek, IF: 4,572
10. Environmental biodegradation of halophenols by activated sludge from two different sewage treatment plants (2017), *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 52(13):1240–1246, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, J. Kwiczak, A. Zgoła-Grześkowiak, Z. Cybulski, E. Kaczorek, IF: 1,536
11. Butylbenzene and tert-butylbenzene – sorption on sand particles and biodegradation in the presence of plant natural surfactants (2018), *Toxins*, 10(9):338, autorzy: **A. Zdarta***, A. Pacholak, M. Galikowska, W. Smułek, E. Kaczorek, IF: 3,895
12. Bacterial biodegradation of 4-monohalogenated diphenyl ethers in one-substrate and co-metabolic systems (2018), *Catalysts* 8:472, autorzy: A. Pacholak, W. Smułek, **A. Zdarta**, A. Zgoła-Grześkowiak, E. Kaczorek, IF: 3,444
13. Properties and potential application of efficient biosurfactant produced by Pseudomonas sp. KZ1 strain (2019), *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 54(2):110-117, autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, A. Trzcińska, Z. Cybulski, E. Kaczorek, IF: 1,536
14. Biological impact of octyl D-glucopyranoside based surfactants (2019), *Chemosphere* 217:567-575, autorzy: **A. Zdarta**, A. Pacholak, W. Smułek, A. Zgoła-Grześkowiak, N. Ferlin, A. Bil, J. Kovensky, E. Grand, E. Kaczorek, IF: 5,108
15. Environmental aspects of the use of Hedera helix extract in bioremediation process (2019), *Microorganisms* 7:43, autorzy: **A. Zdarta***, W. Smułek, A. Pacholak, E. Kaczorek, IF: 4,167
16. Increased biological removal of 1-chloronaphthalene as a result of exposure: A study of bacterial adaptation strategies (2019), Ecotoxicology and Environmental Safety, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109707, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, A. Pacholak, T. Runka, E. Kaczorek, IF: 4,527

17. Co-immobilization of glucose dehydrogenase and xylose dehydrogenase as a new approach for simultaneous production of gluconic and xylonic acid (2019), Materials, autorzy: J. Zdarta, K. Bachosz, O. Degórska, **A. Zdarta**, E. Kaczorek, M. Pinelo, A. S. Meyer, T. Jesionowski, IF: 2,972

* corresponding author

Sumaryczny impact factor: **53,934**

Publikacje w czasopismach bez IF

18. The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase (2018), *Colloids and Interfaces* 2(35):1-22, autorzy: E. Kaczorek, A. Pacholak, **A. Zdarta**, W. Smułek
19. Biodegradacja izomerów chlorotoluenu w obecności naturalnych związków powierzchniowo czynnych (2016), *Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska* 18(1):1-6, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, E. Kaczorek
20. Modyfikacja właściwości powierzchniowych bakterii glebowych w obecności wybranych preparatów grzybobójczych (2016), *Polish Journal of Agronomy* 26:1-7, autorzy: W. Smułek, J. Piotrowiak, **A. Zdarta**, E. Kaczorek
21. Spektroskopia w podczerwieni w ocenie modyfikacji powierzchniowych mikroorganizmów (2016), *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania* 21(4):14-18, autorzy: **A. Zdarta**, I. Gajewska, W. Smułek, E. Kaczorek

Monografie naukowe

22. An effective production of bacterial biosurfactant in the bioreactor (2018), in: Ochowiak M., Woziwodzki S., Doligalski M., Mitkowski P. (eds) Practical aspects of chemical engineering. Lecture notes on multidisciplinary industrial engineering. Springer, Cham, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, E. Kaczorek, ISBN: 978-3-319-73978-6.
23. Zmiana właściwości powierzchniowych wybranych mikroorganizmów pod wpływem związków ropopochodnych (2015), IV Ogólnopolska Konferencja Młodych Naukowców w Poznaniu „Nauka dla środowiska przyrodniczego", autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, E. Kaczorek

24. Oddziaływanie związków chloroaromatycznych i naturalnych surfaktantów na bakterie środowiskowe (2015), 1st International symposium for students and PhD students „Environmental biotechnology" in Gliwice, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, E. Kaczorek
25. Analiza ekstraktów saponin z różnych surowców roślinnych (2015), Ogólnopolskie sympozjum Nauka i przemysł - metody spektroskopowe, nowe wyzwania i możliwości, autorzy: W. Smułek, **A. Zdarta**, E. Kaczorek
26. Zastosowanie pomiarów spektrofotometrycznych do oceny wpływu warunków środowiskowych na aktywność monooksygenazy heskadekanowej (2015), Ogólnopolskie sympozjum Nauka i przemysł - metody spektroskopowe, nowe wyzwania i możliwości, autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, K. Sałek, E. Kaczorek
27. Identyfikacja enzymów z *Pseudomonas stutzeri* z zastosowaniem spektrometrii mas techniką MALDI-TOF (2015), Ogólnopolskie sympozjum Nauka i przemysł - metody spektroskopowe, nowe wyzwania i możliwości, autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, Ł. Marczak, E. Kaczorek, A. Olszanowski
28. Spektroskopia UV-Vis w analizie toksyczności ekstraktów roślinnych na bakterie środowiskowe (2016), Nauka i przemysł - metody spektroskopowe, nowe wyzwania i możliwości, autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, E. Kaczorek
29. Spektroskopia w podczerwieni w ocenie modyfikacji powierzchniowych mikroorganizmów (2016), Nauka i przemysł- metody spektroskopowe, nowe wyzwania i możliwości, autorzy: **A. Zdarta**, I. Gajewska, W. Smułek, E. Kaczorek
30. Tetralin and decalin biodegradation and influence on soil microbial cells (2019), 17th International Conference on Chemistry and the Environment, autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, E. Kaczorek
31. Bioaugmentation for freshwater hydrocarbon contaminants removal (2019), 17th International Conference on Chemistry and the Environment, autorzy: **A. Zdarta**, E. Kaczorek

Liczba cytowań: **82**

h-index: **5**

Publikacje w przygotowaniu

32. Insight in cells modifications after long-term hydrocarbons exposure, autorzy: **A. Zdarta**, J. Tracz, M. Łuczak, E. Kaczorek
33. Surfactant addition in diesel oil degradation – how can it help the microbes? autorzy: **A. Zdarta**, W. Smułek, A. Pacholak, B. Dudzińska-Bajorek, E. Kaczorek
34. Exploring biodegradation of four 5-nitrofuran derivatives by microbes present in rural and municipal activated sludge, autorzy: A. Pacholak, **A. Zdarta**, R. Frankowski, E. Kaczorek

Staże naukowe:

08.04 – 07.05.2015 r. Technical University of Denmark, Department of Environmental Engineering

09.03 – 27.03.2015 r. Aarhus University, Department of Environmental Science

25.05 – 31.05.2015 r. Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Gnieźnie, Instytut Ochrony Środowiska

Stypendia:

2015 r. stypendium celowe dla doktorantów w ramach projektu Inżynier Przyszłości. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego Politechniki Poznańskiej; projekt współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego i Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, priorytet IV Szkolnictwo wyższe i nauka, działanie 4.3 „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego uczelni w obszarach kluczowych w kontekście celów strategii Europa 2020" POKL.04.03.00-00-259/12

Laureatka stypendium dla najlepszych doktorantów Politechniki Poznańskiej oraz stypendium projakościowego w latach 2015, 2016, 2017, 2018,

Udział w projektach badawczych:

1. *Identyfikacja i charakterystyka roli stałego nośnika hydrofobowych zanieczyszczeń i ich degradacja przez mikroorganizmy środowiskowe*, projekt Preludium 10 (2016-2020); rola w projekcie: **kierownik**, okres zatrudnienia: 01.10.2016-09.02.2020 r.
2. *Biodegradacja pochodnych nitrofuranu przez bakterie środowiskowe – od szlaków metabolicznych po zmiany w proteomie i genomie*, projekt Opus 14 (2018-2021); rola w projekcie: **wykonawca**; okres zatrudnienia: 26.09.2018-30.03.2019 r.
3. *Określenie modyfikacji komórek bakterii środowiskowych zachodzących w trakcie degradacji związków węglowodorowych z udziałem surfaktantów pochodzenia roślinnego, alikilopoliglikozydów i biosurfaktantów*, projekt Opus 4 (2013-2017); rola w projekcie: **wykonawca**; okres zatrudnienia: 12.12.2014-07.04.2017 r.
4. *Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych*, realizowany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007 – 2013, Oś Priorytetowa 1: „Badania i rozwój nowocze-snych technologii", Działania: 1.1. Wsparcie badań naukowych dla budowy gospodarki opartej na wiedzy, Poddziałania 1.1.2. Strategiczne programy badań naukowych i prac rozwojowych, w zakresie „nowe materiały i technologie", „biotechnologia i bioinżynieria", a także „rolnictwo i środowisko". Zielona Chemia (2010-2015); rola w projekcie: **wykonawca**; okres zatrudnienia: 07-08.2013 r.
5. *Wpływ surfaktantów zawierających reszty cukrowe na mikroorganizmy środowiskowe*, projekt 03/32/DSMK/0721, rola w projekcie: **kierownik**; okres realizacji projektu: 10.05.2017 – 30.11.2017 r.
6. *Optymalizacja procesu otrzymywania surfaktantu pochodzenia mikrobiologicznego i jego zastosowanie w biodegradacji oleju mineralneg*o, projekt 03/32/DSMK/0621, rola w projekcie: **wykonawca**; okres realizacji projektu: 26.04.2016 – 30.11.2016 r.
7. *Wpływ wybranych leków przeciwbólowych na bakterie probiotyczne*, projekt 03/32/SBAD/0911, rola w projekcie: **wykonawca**; okres realizacji projektu: 18.06 – 30.11.2019 r.

Prezentacje wyników badań na konferencjach naukowych:

- w formie wystąpień ustnych (międzynarodowe/krajowe): **13/9**

- w formie plakatów (międzynarodowe/krajowe): **13/15**

Działalność organizacyjna oraz na rzecz popularyzacji nauki i Uczelni

2016 – 2017 Członek Senatu Politechniki Poznańskiej

2016 – 2017 Przewodnicząca Uczelnianego Samorządu Doktorantów Politechniki Poznańskiej

2015 – 2017 członek Wydziałowego Samorządu Doktorantów, Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej

Członek komitetu organizacyjnego konferencji BioOrg w latach 2015, 2017 i 2019,

Członek koła Naukowego Technologii Chemicznej w latach 2015-2019,

Wolontariusz w ramach Nocy Naukowców na Politechnice Poznańskiej w latach 2015, 2016, 2017, 2018, 2019,

Zaangażowanie w organizację Drzwi Otwartych i Dnia dla Dziewczyn na Politechnice Poznańskiej w 2018 r.

Organizacja warsztatów chemicznych „Różne oblicza chemii" dla uczniów szkół gimnazjalnych w 2016 r.

STRESZCZENIE

Bakterie posiadające zdolność rozkładu zanieczyszczeń węglwodorowych są cennym narzędziem w usuwaniu ksenobiotyków ze środowiska naturalnego. Dane literaturowe sugerują, że komórki mikroorganizmów posiadające tę zdolność charakteryzują się zmodyfikowanymi, w stosunku do innych mikroorganizmów, parametrami powierzchniowymi, takimi jak podwyższona hydrofobowość powierzchni komórki, zwięszona przepuszczalność błon komórkowych czy niska wartość potencjału elektrokinetycznego. Obserwowane są także zmiany aktywności specyficznych enzymów biorących udział w metabolizowaniu szkodliwych związków.

Biorąc pod uwagę powyższe informaje, celem niniejszej pracy była analiza możliwości indukcji zmian właściwości powierzchniowych i podwyższenia zdolności biodegradacyjnych komórek mikroorganizmów wyizolowanych ze środowiska naturalnego. Wyziolowane z próbek gleby mikroorganizmy szczepów *Raoultella planticola* M01, *Raoultella ornithinolytica* M03 oraz *Acinetobacter calcoaceticus* M1B zdolne do wzrostu na podłożu z dodatkiem oleju napędowego poddano 12-miesięcznej ekspozycji na mieszaninę węglowodorów aromatycznych, alifatycznych lub olej napędowy. W tym czasie monitorowano wartości poszczególnych parametrów powierzchniowych komórek, takich jak hydrofobowość powierzchni, potencjał elektrokinetyczny czy rozkład wielkości cząstek. Po zakończeniu okresu 12-miesięczenej ekspozycji na węglowodory przperowadzono szereg prób mających określić zmiany przepuszczalności błon komórkowych, aktywności enzymów, profile błonowych kwasów tłuszczowych, a także proteomu oraz genomu badanych mikroorganizmów w porównaniu do komórek nieeksponowanych na zanieczyszczenia węglowodorowe. Potencjał aplikacyjny mikroorganizmów o zmienionych w wyniku ekspozycji na węglowodory właściwościach przebadano wykonując szereg testów biodegradacyjnych w układach modelowych oraz z wykorzystaniem wody pobranej z dwóch zbiorników słodkowowdnych.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań wskaują, że mikroorganizmy eksponowane na zanieszyczczenia węglowodorowe charakteryzowały się zmianą właściwości powierzchniowych w kierunku cech bardziej hydrofobowych i ułatwiających im przyłączenie oraz transport związków węglowodorowych do wnętrza komórek. Zaobserwowane zmiany aktywności metabolicznej 1,2-dioksygenazy katecholowej oraz

2,3-dioksygenazy katecholowej biorących udział w rozkładzie związków aromatycznych wskazują również na zróżnicowane szlaki degradacji węglowodorów w zależności od szczepu bakteryjnego. Zaobserwowano również, że ze względu na duże zapotrzebowanie energetyczne oraz skomplikowane zmiany metaboliczne mające na celu zwiększenie płynności błony oraz aktywację wybranych genów i zwiększoną akumulację białek, obserwowane modyfikacje właściwości charakteryzują się niewielką trwałością po usunięciu ze środowiska czynnika stresowego, jakim były węglwoodory. Należy również dodać, że przeprowadzone testy biodegradacji związków aromatycznych, alifatycznych i oleju napędowego przez badane szczepy *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 i *A. calcoaceticus* M1B wykazały zróżnicowany wpływ długotrwałej ekspozycji komórek na węglwodoory na ich efektywność w procesach bioremiediacji. Niemniej jednak, bioaugmentacja badanymi mikroorganizmami próbek wody jeziornej zanieczyszczonej olejem napędowym przyniosła pozytywne rezultaty, a układy z dodatkiem komórek poddanych wcześniejszej ekspozycji na węglwodory charakteryzowały się wysokimi wydajnościami biodegradacji oleju napęowego.

Należy podkreślić, że pozytywny wpływ ekspozycji komórek na związki węglwoodorowe stanowi obiecujący materiał do dalszych badań nad indukcją zmian w komórkach mikroorganizmów, a opracowane i zaprezentowane w ramach przedkładanej rozprawy doktroskiej wyniki pozwoliły lepiej zrozumieć mechanizmy rządzące procesem adaptacji komórek do biodegradacji węglowodorów. Testy aplikacyjne z wykorzystaniem wody jeziornej dostrczyły cennych informacji na temat wpływu bioaugmentacji na autochtoniczne mikrobiomy zbiorników słodkowodnych, a także potwierdziły potencjalne zastosowanie aplikacyjne uzyskanych bakterii o zmienionych właściwościach.

ABSTRACT

Bacteria with the ability to break down hydrocarbon impurities are a valuable tool in removing xenobiotics from the environment. Literature data suggest that microbial cells possessing this ability are characterized by modified surface parameters, such as increased hydrophobicity of the cell surface, increased permeability of cell membranes or low value of electrokinetic potential, compared to other microorganisms. Also, changes in the activity of specific enzymes involved in the metabolism of harmful compounds are observed.

Considering the above, the purpose of this work was to analyze the possibilities of changes induction in surface properties and increase the biodegradability of microorganism cells isolated from the natural environment. Microorganisms of *Raoultella planticola* M01, *Raoultella ornithinolytica* M03 and *Acinetobacter calcoaceticus* M1B strains isolated from soil samples capable of growing on the medium with the addition of diesel oil were subjected to a 12-month exposure to a mixture of aromatic hydrocarbons, aliphatic hydrocarbons or diesel oil. During this time, the values of cell surface parameters, such as surface hydrophobicity, electrokinetic potential, and particle size distribution were monitored. At the end of the 12-month hydrocarbon exposure period, a number of tests were performed to determine changes in cell membrane permeability, enzyme activity, membrane fatty acid profiles, as well as the proteome and genome of the microorganisms tested. Obtained results were compared to those obtained for the non-exposed cells. The application potential of microorganisms with properties changed as a result of exposure to hydrocarbons was tested by performing a series of biodegradation tests in model systems and using water collected from two freshwater tanks.

The research results presented in this paper indicate that microorganisms exposed to hydrocarbons were characterized by a change in cell surface properties towards more hydrophobic features, thus facilitating their attachment and transport of hydrocarbon compounds into the cells. Observed changes in metabolic activity of catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase involved in the decomposition of aromatic compounds also indicate different hydrocarbon degradation pathways depending on the bacterial strain. It was also observed that due to the high energy demand and complicated metabolic changes aimed at: increasing membrane fluidity, activation of selected genes and increased protein accumulation, the observed property modifications were characterized by low stability after removal of the stress factor from the environment, which was hydrocarbons. It should also be

added that the biodegradation tests of aromatic, aliphatic and diesel compounds carried out by the tested strains of *R. planticola* M01, *R. ornithinolytica* M03 and *A. calcoaceticus* M1B showed a diverse effect of long-term exposure of cells to hydrocarbons on their effectiveness in bioremediation processes. Nevertheless, bioaugmentation with tested microorganisms of lake water contaminated with diesel oil samples gave positive results, and systems with the addition of cells subjected to previous exposure to hydrocarbons were characterized by high biodiesel oil yields.

It should be emphasized that the positive effect of cell exposure to hydrocarbons is a promising material for further research on the induction of changes in cells of microorganisms, and the results developed and presented in the framework of the presented doctoral dissertation results have allowed to better understand the mechanisms governing the process of cell adaptation to the biodegradation of hydrocarbons. Application tests using lake water, they provided valuable information on the impact of bioaugmentation on the autochthonous microbiome of freshwater reservoirs, and also confirmed the potential application of obtained bacteria with changed properties.

ANEKS

Tabela S. 1. Wyniki testów biochemicznych wyizolowanych szczepów uzyskane z wykorzystaniem aparatu Vitek® 2.

Tabela S. 2. Opis oznaczeń substratów wykorzystywanych w testach biochemicznych na aparacie Vitek® 2. Jeśli nie podano inaczej, oznaczenie literowe oznacza test na wykorzystanie podanego związku jako źródła węgla

Tabela S. 2. Wyniki identyfikacji genetycznej i biochemicznej z uwzględnieniem stopnia dopasowania do bazy biochemicznej oraz pochodzenia próbki.

Rysunek S. 2. Relatywny udział procentowy poszczególnych mikroorganizmów na różnych poziomach taksonomicznych w próbkach wody jeziornej 1 na poziomie gatunku 14 i 60 dni po bioaugmentacji mikroorganizmami z próby kontrolnej (W1+NE) lub eksponowanymi (W1+E)

Rysunek S. 3. Relatywny udział procentowy poszczególnych mikroorganizmów na różnych poziomach taksonomicznych w próbkach wody jeziornej 2 na poziomie gatunku 14 i 60 dni po bioaugmentacji mikroorganizmami z próby kontrolnej (W1+NE) lub eksponowanymi (W1+E)