

# Charakterystyka wybranych szczepów bakterii degradujących węglowodory ropy naftowej

*Edward Galas*

*Ewa Kwapisz*

*Łucja Tarabasz-Szymańska*

*Alina Krystynowicz*

*Tadeusz Antczak*

*Agnieszka Oryńska*

Instytut Biochemii Technicznej

Politechnika Łódzka

Łódź

## 1. Wprowadzenie

Skażenie środowiska substancjami ropopochodnymi stało się w ostatnich latach jednym z najpoważniejszych problemów ekologicznych. Przedstawianie się niedostatecznie oczyszczonych ścieków rafinerijno-petrochemicznych do otwartych zbiorników wodnych, wód gruntowych, czy też ziemi uprawnej może spowodować poważne następstwa, wynikające z silnie toksycznego i kancerogennego charakteru tych substancji.

Z dotychczasowych doświadczeń wynika, że zastosowanie metod biotechnologicznych jako ostatniego etapu oczyszczania ścieków obciążonych związkami ropopochodnymi stanowi najbardziej racjonalny sposób ich uzdatniania (1-4). Aby można było takie metody wykorzystać, trzeba przede wszystkim dysponować odpowiednimi biopreparatami (specjalnie do tego celu wyselekcjonowanymi zestawami drobnoustrojów) oraz ustalić czynniki determinujące ich skuteczne i bezpieczne użycie w warunkach naturalnych. Dla przygotowania tego typu preparatów niezbędne jest przeprowadzenie kompleksowych badań, obejmujących między innymi: dobór warunków izolowania i selekcji szczepów oraz określenie ich właściwości fizjologiczno-biochemicznych, zdolności tworzenia surfaktantów, aktywności wybranych układów enzymatycznych, efektywności wykorzystania różnego typu węglowodorów, produktów metabolizmu, analizy zjawisk kometabolizmu, itp.

Wiadomo, że istnieje duża grupa drobnoustrojów, zarówno bakterii, drożdży, jak i grzybów strzępkowych, wykazujących zdolność do rozkładu węglowodorów. Do najbardziej aktywnych w tym zakresie zaliczyć należy gatunki:

*Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Xantomonas*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* (1-4).

W mieszaninie węglowodorów nie wszystkie związki są równie łatwo rozkładane. Alifatyczne węglowodory są łatwiej degradowane niż aromatyczne, długołańcuchowe parafiny są chętniej rozkładane niż krótkołańcuchowe, nasycone związki są łatwiej utylizowane niż nienasycone, związki o rozgałęzionych łańcuchach są trudniej degradowane od nierozgałęzionych (5-6). Do trudno przyswajalnych należą wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, chloropochodne bifenyle i inne. Bardzo często o szybkości przyswajania węglowodorów decyduje zdolność szczepu do emulgowania substratu. Proces asymilacji węglowodorów może być zatem przyspieszony przez dodanie wybranych biosurfaktantów (7).

W procesach biodegradacji węglowodorów charakterystyczne jest zjawisko stosunkowo sprawnego usuwania głównej części skażeń, w ilości 90-95% ich puli, natomiast likwidacja pozostałej części tych zanieczyszczeń napotyka na ogromne trudności.

W biodegradację węglowodorów włączone są enzymy należące do oksygenaz, dehydrogenaz i hydrolaz. Utlenienie alkanów rozpoczyna zazwyczaj kompleks monoooksygenaz, prowadząc reakcje terminalnej lub subterminalnej oksydacji. Oksygenazy właściwe — dioksygenazy — rozpoczynają proces degradacji benzenu. Intermediat przemian — katechol — może być utleniany przez dwa rodzaje oksygenaz, tj. przez 1,2- lub 2,3- dioksygenazę katecholową (5). Do rozkładu alkenów jest wymagana obecność oksygenaz mieszanych. Biorą one także udział w rozkładzie policyklicznych związków aromatycznych. W utlenianie alkoholi do aldehydów i kwasów włączone są dehydrogenazy współdziałające z jednym z nukleotydów nikotynamidoadeninowych. W procesie rozkładu węglowodorów aromatycznych uczestniczą hydrolazy, powodując ich rozpad do prostszych związków, które mogą być dalej degradowane w szlakach metabolizmu centralnego.

W Instytucie Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej prowadzi się od kilku lat intensywne badania nad skringiem drobnoustrojów degradujących ropę oraz obserwacje zjawisk towarzyszących asymilacji węglowodorów ze skażonych ropopochodnymi substancjami środowisk. Wyizolowano ponad 400 szczepów wykazujących mniejszą lub większą zdolność do degradacji poszczególnych grup węglowodorów. Wyniki otrzymane dla czterech wybranych spośród nich kultur bakteryjnych są tematem tego opracowania.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Szczepy stosowane do badań

Materiał biologiczny do badań stanowiły cztery szczepy należące do rodzajów *Bacillus* sp. N2, *Bacillus* sp. BP, *Pseudomonas* 141, *Micrococcus* R5.4, wyizolowane ze ścieków petrochemicznych lub gruntu pochodzącego z miejsc przeładunku paliw.

## 2.2. Metody izolowania, przechowywania i hodowli badanych szczepów

Izolowanie drobnoustrojów bytujących w wymienionych środowiskach prowadzono na podłożach agarowych, zawierających zestaw podstawowych soli mineralnych lub w podłożu A, zawierającym glukozę 0,5 g/l, ekstrakt drożdżowy 0,5 g/l,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  6 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 g/l, wodę destylowaną. pH podłoży ustalano na 5,5-6,5. Do podłoży dodawano olej napędowy w ilości 20  $\mu\text{l}$  w formie zemulgowanej lub w postaci filmu rozprowadzonego na powierzchni podłoża. Hodowle płynne prowadzono głównie w podłożu A, w 500 ml kolbach płaskodennych zawierających po 50 ml pożywki, na wstrząsarce mimośrodowej o szybkości obrotów 210/min i amplitudzie 4,5 cm. Temperatura hodowli wynosiła 27°C, a jej czas 7-9 dni.

## 2.3. Stężenie biomasy

W podłożu hodowlanym oznaczano stężenie biomasy metodą pośrednią, dokonując pomiaru zmętnienia płynu hodowlanego. W tym celu zawiesinę rozcieńczano 10-krotnie i mierzono absorbancję prób przy 720 nm względem wody destylowanej. Wyniki przeliczano na jednostki (g sm/l) na podstawie krzywych wyznaczonych po uprzednim wysuszeniu badanych próbek biomasy.

## 2.4. Określanie stopnia degradacji oleju napędowego w warunkach hodowli płynnej

Doświadczenie obejmowało hodowlę badanych szczepów w 50 ml podłoża A z dodatkiem 6% oleju napędowego i określenie jego ubytku po dziewięciu dniach hodowli wstrząsanej. Próbie odniesienia stanowiła analogiczna zawiesina, której nie szczepiono. Po hodowli zawartość kolb pozostawiano na noc w temperaturze 4°C i następnego dnia całość wirowano przy 15 000 rpm w ciągu 20 min. Ilość nie zużytej podczas hodowli ropy oznaczano objętościowo. Przy obliczaniu ubytków oleju uwzględniano odparowanie substratu, oznaczone w próbie odniesienia.

## 2.5. Oznaczanie aktywności dehydrogenaz

Wstępne parametry oznaczenia ustalono na podstawie metodyki opracowanej przez Bobkową (8) i Szpilową (9). Oznaczenie wykonano z użyciem biomasy z hodowli płynnej w podłożu A, po uprzednim jej odwirowaniu, zważeniu i równomiernym zawieszeniu w 1 ml sterylnej wody destylowanej. Do prób dodawano 3 ml 0,2M buforu fosforanowego o pH 8 i 1 ml 0,1% roztworu chlorku 2,3,5-trifenylotetrazoliowego. Próby inkubowano w temperaturze 30°C w ciągu 2 godz. Reakcję przerywano dodając 3 ml lodowatego kwasu octowego. Próby wirowano, a barwnik związany z biomasą ekstrahowano 10 ml kwasu octowego. Absorbancję zarówno eluatu, jak i płynu po oddzieleniu komórek oznaczano przy 490 nm. Wartości absorbancji sumowano i odnoszono do krzywej wzorcowej. Aktywność wyrażano w jednostkach gęstości optycznej roztworu w przeliczeniu na 1 mg sm komórek.

## 2.6. Analiza produktów biodegradacji

Produkty biodegradacji oleju napędowego przez badane szczepy analizowano metodą chromatografii gazowej, wykorzystując aparat firmy Hewlett-Packard model HP 5890 wyposażony w kolumnę kapilarną Supelcowax 10, o rozmiarach 30 m · 0,53 mm ID, film 1,0 µm oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny (300°C). Temperatura początkowa pieca wynosiła 50°C (5 min), ogrzewanie do 280°C prowadzono w ciągu 35 min. Próby do oznaczeń składu mieszanin węglowodorów nie wykorzystanych podczas hodowli drobnoustrojów, przygotowywano metodą Solid Phase Extraction na podstawie metody firmy JT Baker USA. Polega ona na absorpcji węglowodorów alifatycznych i aromatycznych w kolumnienkach wypełnionych mikroporowatym szkłem (wielkość ziaren 40 nm, rozmiary por 6-27,5 nm) z podstawionymi grupami oktadecylowymi, a następnie ekstrakcji węglowodorów dichlorometanem lub n-heksanem. Uzyskane piki identyfikowano według wewnętrznej biblioteki spektrometru masowego pracującego w systemie Scan (nr NBS75KL).

## 3. Wyniki badań

Badania mikroflory środowisk skażonych pochodnymi ropy naftowej prowadzone pod kątem przygotowania biopreparatów do bioremediacji konkretnych miejsc skażenia węglowodorami, to złożone postępowanie skринingowe, wymagające wykonania szeregu żmudnych prób hodowlanych, wielu testów biochemicznych oraz prób technologicznych (4,5).

Zabiegi skринingowe, którym poddano wymienione w materiałach szczepy obejmowały:

- a) zbadanie ich zdolności do wzrostu w obecności węglowodorów ropy naftowej,
- b) określenie tolerancji na podwyższone stężenia ropy naftowej,
- c) oznaczenie stopnia zużycia substratu,
- d) zbadanie zdolności do emulgacji frakcji organicznej,
- e) oznaczenie aktywności dehydrogenaz wraz ze wstępnym określeniem stopnia indukcyjności systemu,
- f) analiza chromatograficzna produktów biodegradacji.

Rezultaty wstępnej oceny wzrostu szczepów w obecności węglowodorów ropy naftowej dokonanej na podstawie wyników hodowli w podłożu A w formie stałej lub płynnej przedstawiono w tabeli 1.

Wszystkie z wymienionych szczepów wykazywały szybki i obfity wzrost w obecności oleju napędowego. Warstewka oleju, pokrywająca powierzchnię podłoża stałego znikła w ciągu 3-4 dni hodowli. Najwyższą zdolność emulgowania frakcji organicznej w podłożu płynnym wykazywały szczepy *Bacillus* sp. BP i N2.

TABELA 1  
OBSERWACJE WZROSTU BADANYCH SZCZEPÓW BAKTERII W PODŁOŻU A

Szczep	Obserwacje wzrostu	
	podłoże stałe	podłoże płynne
<i>Bacillus</i> sp. BP	kolonie jasnobezowe, krótkie pałeczki, wyraźne „ściąganie” filmu ropy w kierunku kolonii, zużycie substratu po 4 dniach hodowli	obfity wzrost wokół kropelek ropy, silne emulgowanie substratu
<i>Pseudomonas</i> sp. 141	kolonie beżowoszare, ruchliwe pałeczki, zużycie substratu po 3 dniach hodowli	wzrost dobry, słabe emulgowanie substratu
<i>Bacillus</i> sp. N2	długie pałeczki, ślady substratu po 3 dniach hodowli	wzrost obfity, dobra emulgacja substratu
<i>Micrococcus</i> sp. R5.4	drobne kolonie, ślady substratu po 4 dniach hodowli	wzrost dobry, słabe emulgowanie substratu

Zdolność namnażania się szczepów w podłożu płynnym A, zawierającym olej napędowy w różnych stężeniach (od 2 do 10%) przedstawiono na rycinie 1. Obrazuje ona wzrost szczepów *Bacillus* sp. BP i N2, reprezentatywnych dla wszystkich, stosowanych w pracy drobnoustrojów. Dla żadnej z badanych kultur nie obserwowano wyraźnie negatywnego wpływu zwiększających się stężeń węglowodorów na ich wzrost, natomiast w miarę trwania hodowli uwidoczniła się zdolność adaptacji szczepów do wzrastających stężeń substratu. W ostatnich dniach hodowli obserwowano wyraźnie najbardziej intensywny wzrost szczepów w obecności najwyższych stężeń węglowodorów (10%). Plon biomasy w szóstym dniu hodowli, np. dla szczepu *Bacillus* sp. BP był o 60% wyższy w porównaniu z próbami, w których substrat ten użyto w stężeniu 2%.

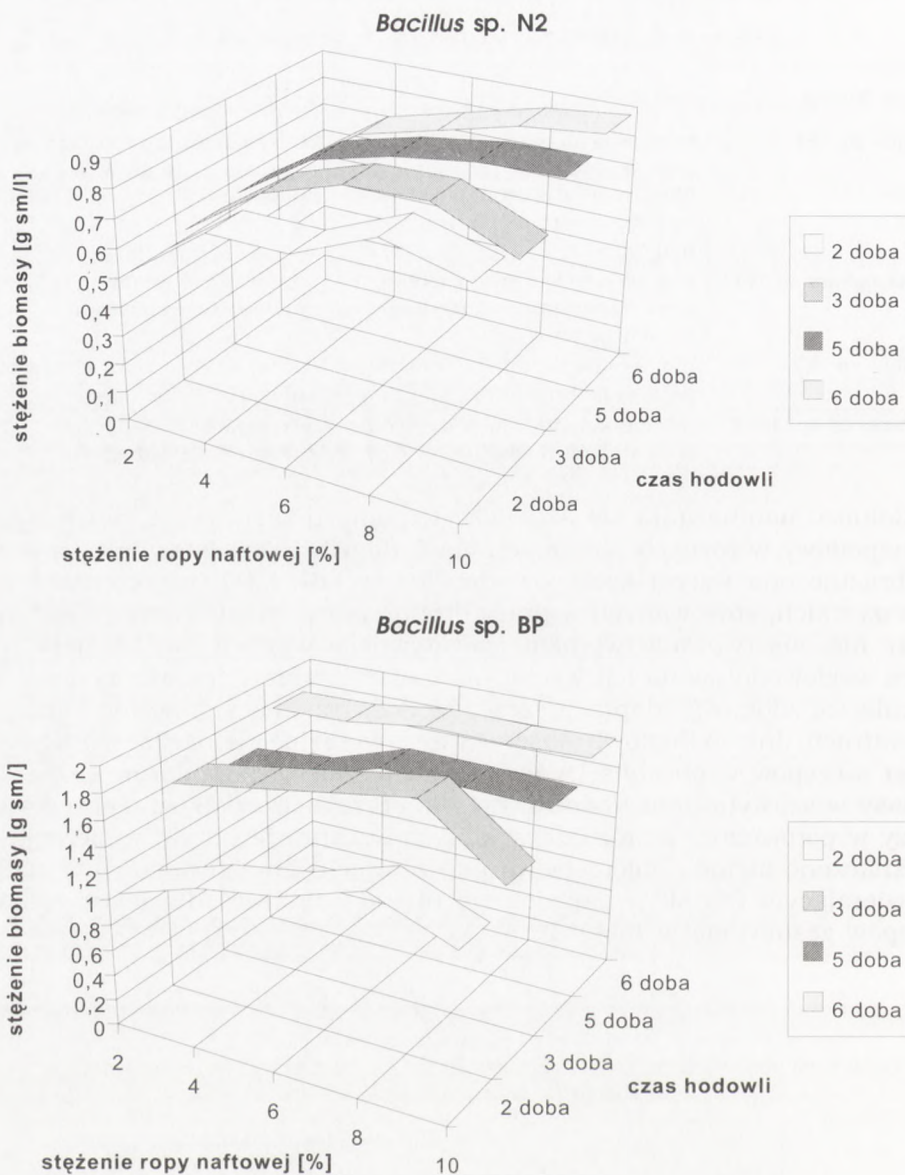
Oznaczone metodą objętościową po dziewięciu dniach hodowli w podłożu A zawierającym 6% oleju napędowego ubytki substratu dla poszczególnych szczepów zestawiono w tabeli 2.

TABELA 2  
ZUŻYCIE OLEJU NAPĘDOWEGO

W CIĄGU 9 DNI HODOWLI SZCZEPÓW *BACILLUS* SP. BP I N2, *PSEUDOMONAS* SP. 141, *MICROCOCCLUS* SP. R5.4 W PODŁOŻU A, ZAWIERAJĄCYM 6% SUBSTRATU

Szczep	Zużycie oleju napędowego (%)
<i>Bacillus</i> sp. BP	70
<i>Pseudomonas</i> sp. 141	64
<i>Bacillus</i> sp. N2	90
<i>Micrococcus</i> sp. R5.4	60

Najwyższe zużycie oleju napędowego w stosowanych warunkach hodowli uzyskano dla szczepów *Bacillus* sp. BP i N2. Porównując te wyniki z danymi zawartymi w tabeli 1 można zauważyć, że wymienione szczepy wykazują również stosunkowo wysoką zdolność emulgowania substratu.

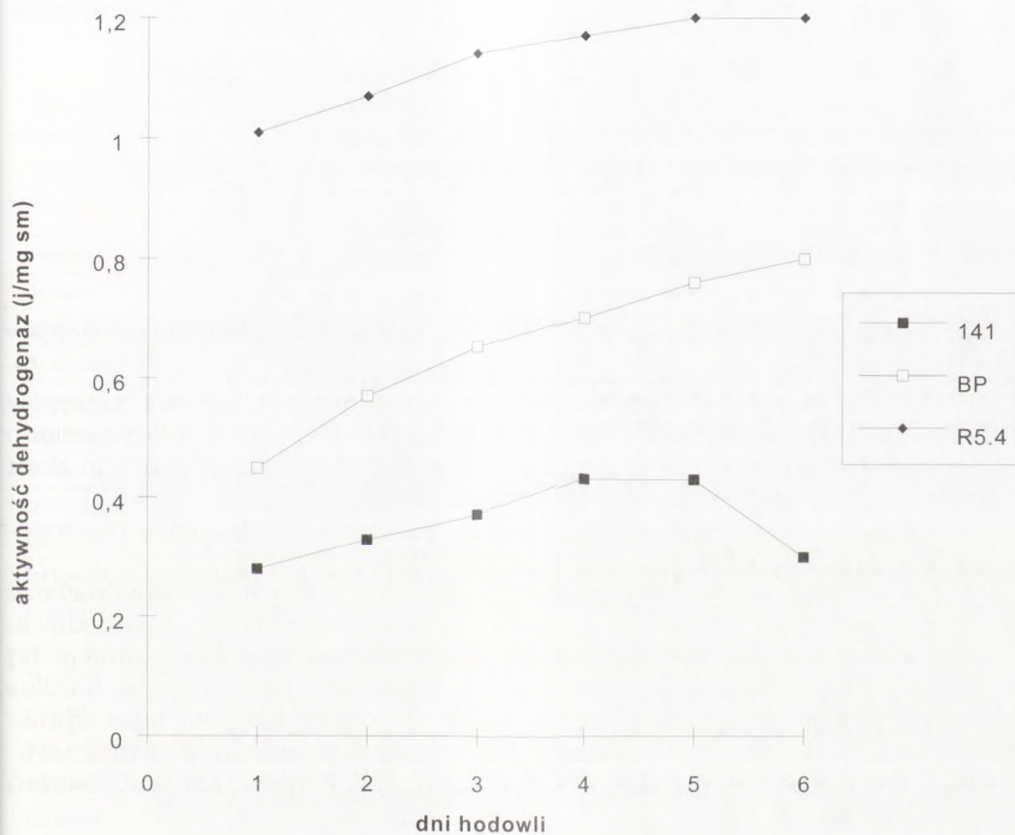


Ryc. 1. Wzrost szczepów *Bacillus sp. N2* i *BP* w podłożu A zawierającym olej napędowy w stężeniach 2-10%.

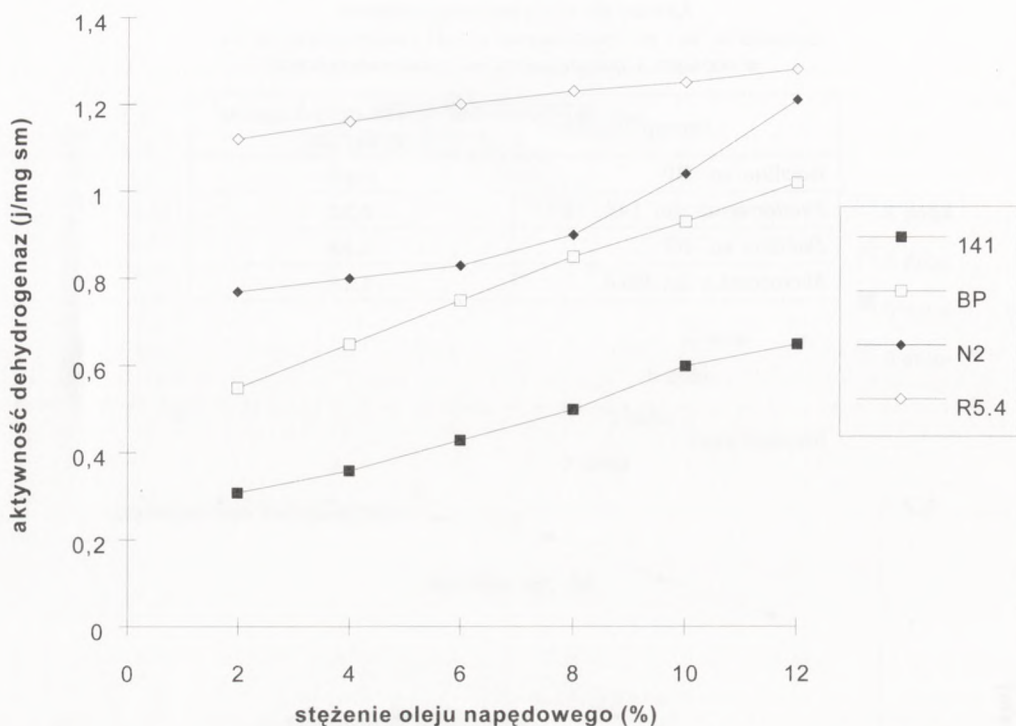
Za wskaźnik zdolności drobnoustrojów do szybkiej biodegradacji węglowodorów można w pewnym stopniu przyjąć aktywność dehydrogenaz, podstawowego systemu enzymatycznego, odpowiedzialnego za utlenienie substratu. Ogólną aktywność dehydrogenaz badanych szczepów, oznaczoną w trzeciej dobie hodowli wstrząsanej w podłożu A, zawierającym 6% oleju napędowego przedstawiono w tabeli 3.

TABELA 3  
 AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZ SZCZEPÓW  
*BACILLUS* SP. N2 I BP, *PSEUDOMONAS* SP. 141 I *MICROCOCCUS* SP. R5.4  
 W PODŁOŻU A ZAWIERAJĄCYM 6% OLEJU NAPĘDOWEGO

Szczep	Aktywność dehydrogenaz (j/mg sm)
<i>Bacillus</i> sp. BP	0,65
<i>Pseudomonas</i> sp. 141	0,37
<i>Bacillus</i> sp. N2	0,88
<i>Micrococcus</i> sp. R5.4	1,15



Ryc. 2. Zmiany aktywności dehydrogenaz szczepów BP, 141 i R5.4 w czasie hodowli w podłożu A, zawierającym 6% oleju napędowego.



Ryc. 3. Wpływ stężenia oleju napędowego w podłożu A na aktywność dehydrogenaz szczepów 141, BP, N2 i R5.4.

Zmiany aktywności dehydrogenaz w czasie 6-dniowej hodowli szczepów *Bacillus* sp. BP, *Pseudomonas* sp. 141 i *Micrococcus* sp. R5.4 przedstawiono na rycinie 2. Aktywność ta rośnie do piątego dnia hodowli. W szóstym dniu inkubacji zachowanie szczepów jest zróżnicowane.

Niekorzystne jest wyraźne obniżenie aktywności dehydrogenaz obserwowane w tym czasie dla szczepu *Pseudomonas* sp. 141.

Wpływ stężenia oleju napędowego (2-12%) na aktywność dehydrogenaz przedstawiono na rycinie 3. Zamieszczono na niej dane z piątego dnia hodowli.

Dla wszystkich badanych szczepów obserwowano wyraźną indukcję tej aktywności przez zwiększające się stężenia substratu. Dla szczepów *Bacillus* sp. BP, *Micrococcus* sp. R5.4 indukcyjność tę można określić jako wprost proporcjonalną do stężenia substratu. Dla pozostałych szczepów zwraca uwagę fakt zróżnicowanej indukcyjności systemu w różnych zakresach stężeń oleju napędowego.

Wyniki analizy chromatograficznej pozostałości oleju napędowego po dziewięciu dniach hodowli w podłożu A, zawierającym substrat w stężeniu 6% obrazują chromatogramy (ryc. 4) oraz tabela 4. Wymienione w tabeli węglowodory (od nonanu do dokozanu) to główne składniki oleju napędowego ziden-

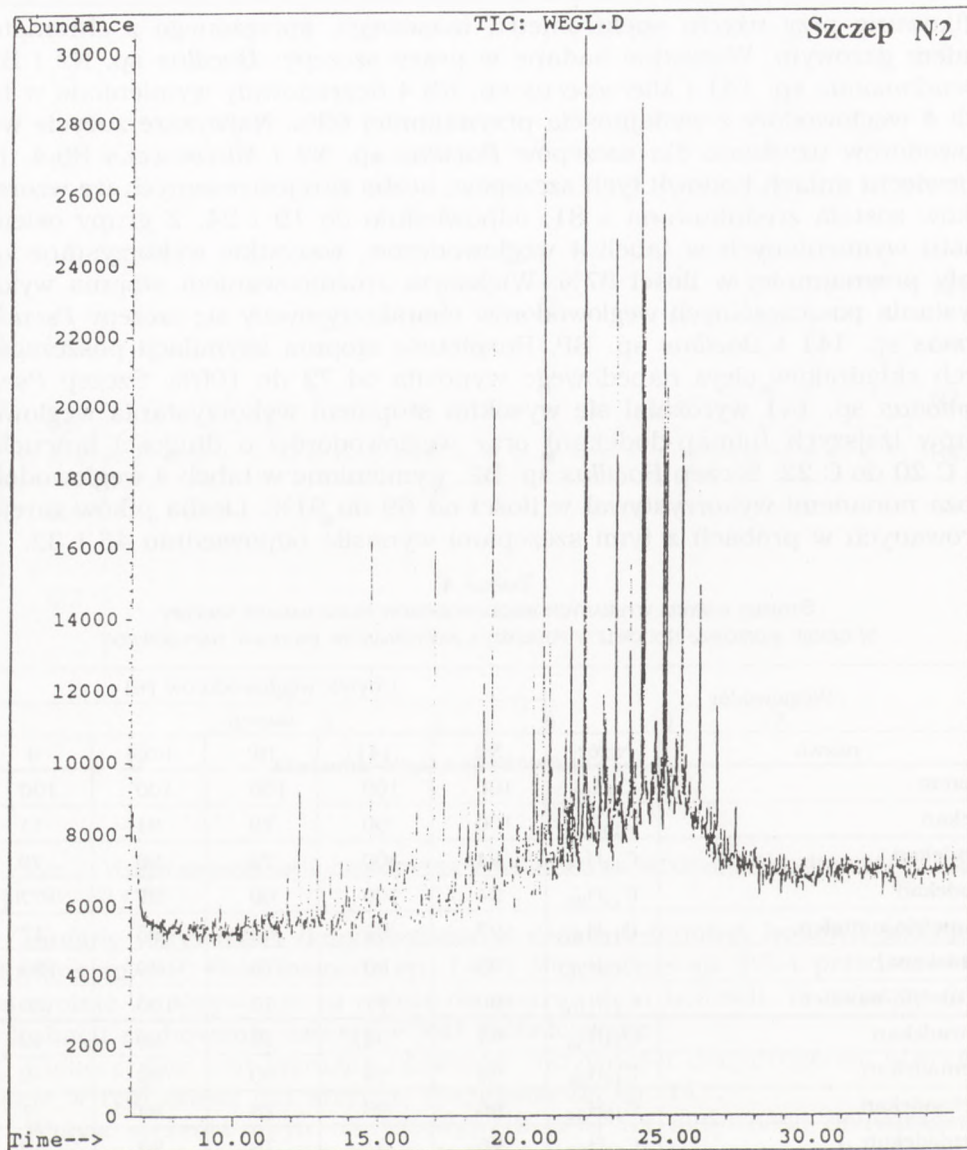


tyfikowane przy użyciu spektrometru masowego, sprzężonego z chromatografem gazowym. Wszystkie badane w pracy szczepy: *Bacillus* sp. N2 i BP, *Pseudomonas* sp. 141 i *Micrococcus* sp. R5.4 degradowały wymienione w tabeli 4 węglowodory z wydajnością przynajmniej 69%. Najwyższe zużycie węglowodorów uzyskano dla szczepów *Bacillus* sp. N2 i *Micrococcus* R5.4. Po dziewięciu dniach hodowli tych szczepów, liczba zarejestrowanych we wzorcu pików została zredukowana z 81, odpowiednio do 19 i 24. Z grupy osiemnastu wymienionych w tabeli 4 węglowodorów, wszystkie wykorzystane zostały przynajmniej w ilości 87%. Większym zróżnicowaniem stopnia wykorzystania poszczególnych węglowodorów charakteryzowały się szczepy *Pseudomonas* sp. 141 i *Bacillus* sp. BP. Rozpiętość stopnia asymilacji poszczególnych składników oleju napędowego wynosiła od 72 do 100%. Szczep *Pseudomonas* sp. 141 wyróżniał się wysokim stopniem wykorzystania węglowodorów lżejszych (nonan-dodekan) oraz węglowodorów o długości łańcucha od C 20 do C 22. Szczep *Bacillus* sp. BP, wymienione w tabeli 4 węglowodory (poza nonanem) wykorzystywał w ilości od 69 do 91%. Liczba pików zarejestrowanych w próbach z tymi szczepami wynosiła odpowiednio 46 i 32.

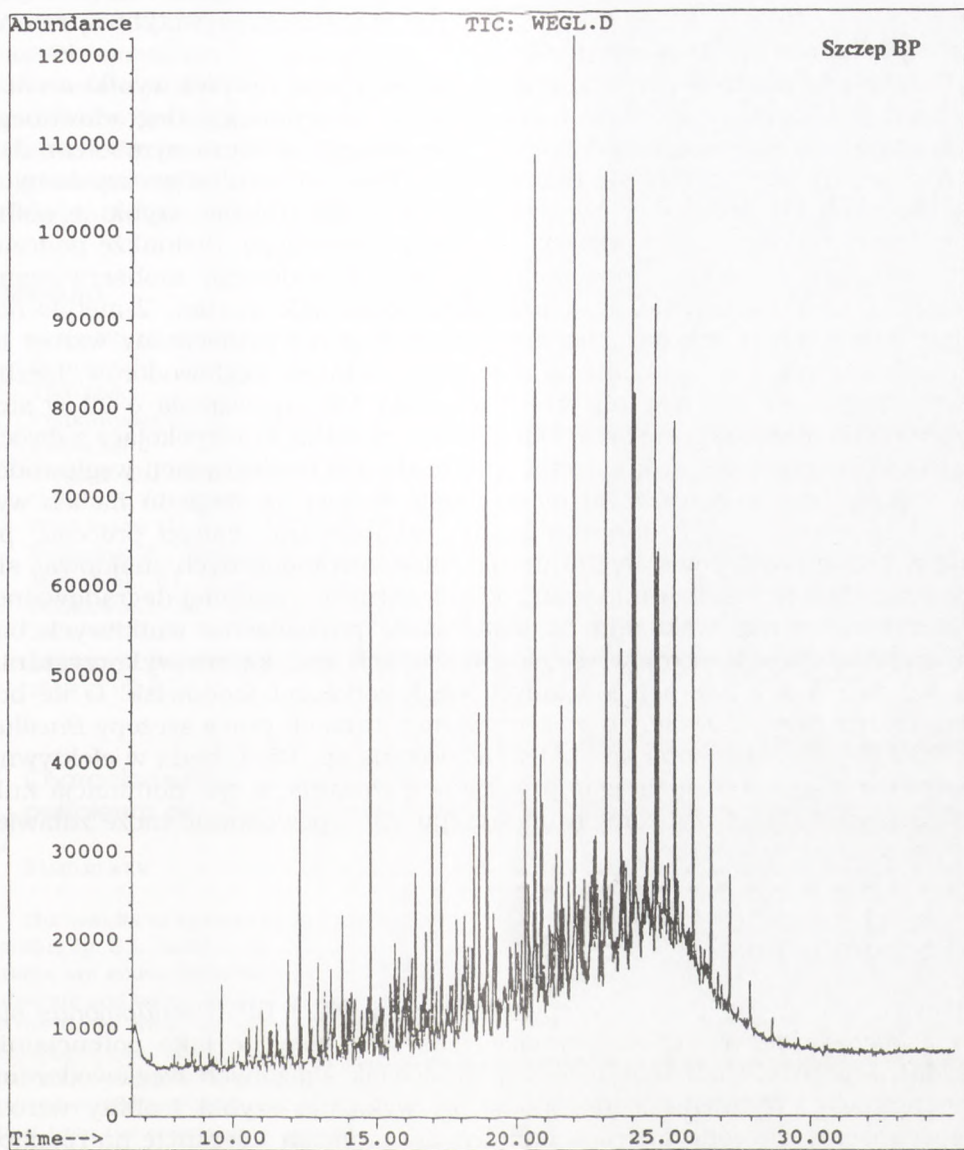
TABELA 4

STOPIEŃ ZUŻYCIA WYBRANYCH WĘGLOWODORÓW PRZEZ BADANE SZCZEPY  
W CZASIE 9-DNIOWEJ HODOWLI W PODŁOŻU A ZAWIERAJĄCYM 6% OLEJU NAPĘDOWEGO

Węglowodor		Ubytek węglowodorów (%)				
		szczep				
nazwa	wzór	N2	141	BP	R5.4	B
nonan	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	100	100	100	100	100
dekan	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	100	90	79	91	-11
undekan	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	94	100	72	90	-70
dodekan	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	94	100	69	87	-77
2-metylo-naftalen	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub>	97	91	85	95	17
tridekan	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	95	83	75	89	-33
1 metylo-naftalen	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub>	100	77	76	100	-50
tetradekan	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	94	94	73	89	-40
pentadekan	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	94	94	80	89	-9
heksadekan	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	96	96	78	94	7
heptadekan	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	96	91	79	93	-3
2,6,10,14-tetrametylopentadekan	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	96	96	78	95	-11
oktadekan	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	96	75	75	93	-18
2,6,10-trimetylododekan	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	96	100	72	93	-35
nonadekan	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	97	84	74	94	-21
eikozan	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	97	100	77	95	3
heneikozan	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	100	100	75	95	21
dokozan	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	100	100	91	100	35
Liczba rejestrowanych pików, wzorzec:81		19	46	32	24	103



Ryc. 4. Analiza chromatograficzna produktów biodegradacji oleju napędowego, prowadzonych przy użyciu szczepów N2 i BP.



Wśród produktów rozkładu oleju napędowego nie zidentyfikowano nowych związków, tj. takich, których nie obserwowano wcześniej w tym surowcu, przed poddaniem go biodegradacji.

W tabeli 4 dla celów porównawczych zamieszczono również wyniki analizy chromatograficznej produktów rozkładu oleju napędowego, degradowanego przy użyciu innego szczepu bakterii, oznaczonego roboczo symbolem „B”. Wyniki tej analizy okazały się diametralnie różne od rezultatów uzyskanych dla omówionych szczepów. Szczep „B” wykazywał równie szybki i obfity wzrost w obecności węglowodorów, jak pozostałe szczepy. Jednakże podczas jego 9-dniowej hodowli w obecności 6% oleju napędowego zaobserwowano obniżenie stężenia jedynie, takich węglowodorów jak: nonan, 2-metylo-naftalen, heksadekan, eikozan, heneikozan i dokozan i jednoczesny wzrost liczby pozostałych z osiemnastu wymienionych w tabeli węglowodorów. Liczba pików zarejestrowanych w tej próbie wynosiła 103, tj. wzrosła o 22 w stosunku do analizowanego wzorca. Odnotowane zjawiska są niepokojące z dwóch względów; po pierwsze, gromadzenie intermediatów biodegradacji węglowodorów, szczególnie tych o niższej masie cząsteczkowej, ze względu na ich wysoką toksyczność może doprowadzić do zahamowania całego procesu, po drugie, wśród nowo powstałych intermediatów metabolicznych znajdują się mogą substancje bardziej toksyczne od pierwotnych i trudniej degradowalne.

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność prowadzenia wnikliwych badań fizjologii drbnoustrojów, selekcyonowanych pod kątem wykorzystania w procesach bioregeneracji skażonych węglowodorami środowisk. O ile bowiem można przypuszczać, że prezentowane w ramach pracy szczepy *Bacillus* sp. N2 i BP, *Pseudomonas* sp. 141 i *Micrococcus* sp. R5.4, będą w efektywny i bezpieczny sposób wspomagać procesy oczyszczania, o tyle dominacja kultur o właściwościach zbliżonych do szczepu „B”, spowodować może zdławienie procesu bioregeneracji.

#### 4. Podsumowanie

Testy, którym poddano szczepy *Bacillus* sp. N2 i BP, *Pseudomonas* sp. 141 i *Micrococcus* sp. R5.4, pozwalają zakwalifikować je jako potencjalnie przydatne w procesach bioregeneracji środowisk skażonych węglowodorami ropy naftowej. Wymienione drobnoustroje wykazują szybki i obfity wzrost w obecności węglowodorów ropy naftowej oraz wysoką tolerancję na rosnące stężenia substratu. Dziewięciodniowa hodowla w obecności 6% oleju napędowego kończy się zużyciem substratu w ilości 60-90% (tab. 2). Poziom aktywności systemu dehydrogenaz w dużym stopniu jest funkcją stężenia węglowodorów w podłożu. Analiza chromatograficzna produktów biodegradacji pozwoliła ustalić, że z grupy osiemnastu zidentyfikowanych węglowodorów, występujących w oleju napędowym w najwyższych stężeniach, wszystkie są asymilowane, a stopień ich wykorzystania waha się w granicach 69-100%.

W wyniku biodegradacji prowadzonych z udziałem szczepów *Bacillus* sp. BP i N2, *Pseudomonas* sp. 141, *Micrococcus* sp. R5.4, liczba pików zareje-

strowanych we wzorcu zmniejszyła się z 81, odpowiednio do 32, 19, 46, 24. Wśród produktów biodegradacji nie zidentyfikowano związków nie obserwowanych wcześniej we wzorcu.

Przedstawione w celach porównawczych wyniki analizy chromatograficznej produktów biodegradacji z udziałem szczepu „B” (gromadzącego liczne produkty pośrednie i kumulującego węglowodory o niższym ciężarze cząsteczkowym) wskazują na bezwzględną konieczność prowadzenia badań fizjologii drobnoustrojów, selekcyjonowanych pod kątem użycia ich w procesach bioremediacji.

## Literatura

1. Betts W. B., (1993), *Gen. Eng. and Biotechnol.*, 13, 1, 49-59.
2. Bouchez M., Blanchet D., Vandersastelle P., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 156-164.
3. Venkateswaran K., Hoaki T., Kato M., Maruyama T., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, 418-424.
4. Taygi R. D., Tran F. T., Chowdhury A. K. M. M., (1993), *Process Biochemistry*, 28, 75-82.
5. Smith M. R., (1990), *Biodegradation*, 1, 191-206.
6. Watkinson R. J., Morgan P., (1990), *Biodegradation*, 1, 79-92.
7. Volkering F., Breure A. M., van Andel J. G., Rulkens W. H., (1995), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 5, 1699-1705.
8. Bobkova A. M., Tarchowa E. P., Tatarienko L. R., (1985), *Prikl. Bioch. i Mikrobiol.*, 24,1,492-494.
9. Pawlaczyk-Szpilowa M., (1980), *Ćwiczenia z mikrobiologii wody i ścieków*, PWN, Warszawa, 92-93.

## Characterization of selected bacterial strains degrading hydrocarbons of petroleum oil

### Summary

The results of special tests which had been carried out with the following bacterial strains *Bacillus* sp. S2, *Bacillus* sp. BP, *Pseudomonas* sp. 141 and *Micrococcus* sp. R5.4 show that these strains are active degraders of petroleum oil hydrocarbons, tolerate high concentrations of the substrate and have a high capability for degradation of hydrocarbons. Petroleum oil was degraded in the range from 60 to 90% after the culture was carried out for 9 days. The activity of dehydrogenases was related to the concentration of the substrate. The gas chromatography analysis of residual hydrocarbons in the medium after 9 days of cultivation proved that the main identified petroleum oil components had been metabolized with the yield from 69 to 100%. Apart from the compounds originally present in crude oil no new by-products were detected in the final medium. The accumulation of shorter chain length hydrocarbons and various new by-products occurred in the case of another tested bacterial strain, designated "B".

### Key words:

biodegradation of petroleum oil, screening of bacteria, products of biodegradation.

### Adres do korespondencji:

Edward Galas, Ewa Kwapisz, Instytut Biochemii Technicznej,  
Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.