

Joanna Brzeszcz, Sławomir Falkowicz, Anna Turkiewicz, Piotr Kapusta  
Instytut Nafty i Gazu, Kraków

## Zdolności metaboliczne bakterii degradujących ksantan i ich wpływ na wybrane płuczki wiertnicze

### Wstęp

W celu powiększenia lepkości i wytrzymałości strukturalnej płuczek wiertniczych stosowane są różne polimery organiczne – zarówno naturalne, jak i syntetyczne. Szczególne znaczenie mają polimery polisacharydowe. Polimery skrobiowe i celulozowe mają za zadanie zapewnienie żądanej lepkości i właściwości smarnych płuczki wiertniczej, a obecność polimerów guarowych i ksantanowych znacznie poprawia zdolność wynoszenia zwiercin [15]. Polimer ksantanowy – zwany inaczej gumą ksantanową, XC-polimerem lub potocznie ksantanem – powstaje na skutek działania bakterii *Xanthomonas campestris* na cukry proste. *Xanthomonas campestris* jest patogenem roślin, a produkcja polimeru znajdującego się w otocze najprawdopodobniej pomaga skolonizować zaatakowany organizm. Polimer ksantanowy zbudowany jest z rdzenia, który tworzą reszty D-glukozy połączone wiązaniem  $\beta$ -1,4-glikozydowym. Co druga cząsteczka jest podstawiona trójsacharydem (wiązanie  $\alpha$ -1,3-glikozydowe) złożonym z dwóch reszt mannozy, rozdzielonych kwasem glukuronowym. Wewnętrzne cząsteczki mannozy są z reguły acetylowane w pozycji 6, a zewnętrzne w ok. 50% podstawione resztą kwasu pirogronowego w pozycjach 4 i 6 [1]. Obecność reszt kwasowych powoduje, że cząsteczka polimeru jest naładowana ujemnie. Cząsteczka przyjmuje strukturę helisy prawoskrętnej, z łańcuchami bocznymi ułożonymi wzdłuż rdzenia, natomiast w roztworach w obecności soli przyjmuje strukturę podwójnej helisy o pięciokrotnej osi symetrii, w której łańcuchy główne ułożone są przeciwnie, a łańcuchy boczne zawijają się wokół nich [5]. Najprawdopodobniej struktura ta odpowiada za wyjątkowe właściwości gumy ksantanowej, co przekłada się na jej szerokie zastosowanie w rozmaitych gałęziach

przemysłu (tablica 1). Roztwór zawierający niewielkie stężenie ksantanu (0,5÷1,5%) charakteryzuje się wysoką lepkością, a gdy do roztworu doda się sól w stężeniu 0,1% lub wyższym, jego lepkość jest niezmienna w zakresie temperatur 0÷100°C. W roztworach o dużej sile jonowej, również poniżej i powyżej zakresu temperatur, ksantan okazuje się stabilny. Co więcej, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne – w odróżnieniu od innych biopolimerów – jest szczególnie odporny na zmiany pH i degradację. Polimer ksantanowy może być używany do obróbki wszystkich rodzajów i odmian płuczek wodno-dyspersyjnych, a jego największą zaletą jest to, że wymagane właściwości reologiczne płuczki wiertniczej uzyskiwane są przy niewielkich stężeniach (tablica 1).

Podczas prac wiertniczych czy rekonstrukcyjnych w większym lub mniejszym stopniu następuje filtracja płuczki do strefy przyodwiertowej. Pozostałe w strefie przyodwiertowej ksantany wpływają w znacznym stopniu na zdolności produktywne tak udostępnionego złoża. W chwili obecnej przyjmuje się, że co najmniej dwa zjawiska są odpowiedzialne za uszkodzenie strefy przyodwiertowej przez dodatki ksantanowe. W czasie pierwszej fazy filtracji polimery ksantanowe wraz z płuczką dostają się do strefy przyodwiertowej i tam zostają zaadsorbowane na ścianach porów – zmieniając ich zwilżalność i niekiedy znacznie obniżając właściwości filtracyjne skały. Następnie stają się częścią właśnie utworzonego placka filtracyjnego, w dużym stopniu wzmacniając go mechanicznie poprzez tworzenie struktury, w której dodatkowo znajdują się cząsteczki blokatora lub zwierciny. Aby skutecznie i efektywnie usunąć przyczyny uszkodzenia przepuszczalności należy zniszczyć strukturę utworzoną przez biopolimer. W tym

Tablica 1. Zastosowanie gumy ksantanowej [4]

Sposób użycia i stosowane stężenie [%]	Funkcja
<b>Żywność i napoje</b> Sosy sałatkowe (0,1÷0,5) Żywność sucha i sproszkowana (0,05÷0,2) Sosy, syropy, polewy, sery topione (0,05÷0,2) Mrożonki (0,05÷0,2) Napoje (0,05÷0,2) Pieczywo bezglutenowe (0,05÷0,2)	Stabilizowanie emulsji Ułatwianie rozpraszania w wodzie Zagęszczanie (zapewnia stabilność cieplną i jednorodną lepkość) Stabilizowanie Stabilizowanie Zwiększenie objętości i trwałości pieczywa
<b>Farmaceutyki i kosmetyki</b> Tabletki Kremy i balsamy (0,1÷1,0) Szampony, mydła w płynie i pasty do zębów	Ułatwianie rozpuszczania (rozpadu) Stabilizowanie emulsji Poprawa warunków „przepływu” i stabilności piany
<b>Rolnictwo</b> Dodatek do karmy dla zwierząt i składnik pestycydów (0,03÷0,4)	Stabilizowanie zawiesin (karma), ułatwianie adhezji cząsteczek i przedłużanie trwałości (pestycydy)
<b>Przemysł naftowy</b> Dodatek do płuczek wiertniczych i cieczy roboczych (0,1÷0,4) Intensyfikacja wydobywania ropy (0,05÷0,2)	Zagęszczanie (w celu nadania odpowiednich parametrów reologicznych), ułatwianie wypierania ropy naftowej poprzez zwiększenie lepkości wody
<b>Przemysł tekstylny</b> Farbowanie tekstyliów (0,05÷0,2)	Tworzenie pian odpornych na działanie temperatur, modyfikowanie przepływu w procesie barwienia tkanin

celu stosuje się niektóre kwasy organiczne i/lub utleniające. Alternatywną metodą rozwiązania tego problemu może być użycie mikroorganizmów. Można otrzymać mikroorganizm dysponujący pełnym zestawem enzymów degradujących polimer ksantanowy, względnie stworzyć układ mikroorganizmów wzajemnie się uzupełniających (tzw. biopreparat). Biopreparaty tworzy się na bazie starannie dobranych szczepów mikroorganizmów, izolowanych wcześniej z naturalnych środowisk [7]. Warunkiem koniecznym pozwalającym na skuteczne użycie technologii

mikrobiologicznej jest dobór biopreparatu zawierającego takie mikroorganizmy, które w danym środowisku znajdują optymalne warunki działania, tzn. posiadają cechy umożliwiające ich adaptację i rozwój. W przypadku polimerów skrobiowych i celulozowych wykazano, że zastosowanie mikroorganizmów przynosi zadowalające efekty [3]. Celem obecnej pracy było uzyskanie i scharakteryzowanie mikroorganizmów degradujących polimer ksantanowy, pod kątem możliwości wykorzystania ich w praktyce przemysłowej.

## Materiały i metody

### Materiały

Polimer ksantanowy czystości technicznej pochodził z BDC Poland. Odczynniki zakupiono w firmach: POCH Gliwice, Sigma, Fluka i Merck. Podłoża mikrobiologiczne zostały wykonane samodzielnie lub zostały zakupione w firmach Merck i Fluka. Test ID 32 GN pochodził z firmy Biomerieux.

### Izolacja i oznaczenie liczby mikroorganizmów

10 g świeżej i zhomogenizowanej gleby przenoszono aseptycznie do 90 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej, zawierającego 0,18% pirofosforanu sodu ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ).

Całość wytrząsano przez 30 minut przy 200 obr./min w temperaturze pokojowej. Po tym okresie nadsącz przenoszono do sterylnej kolby, a następnie, pobierając 1 ml, dokonywano seryjnych rozcieńczeń. 1 ml każdego rozcieńczenia wysiewano na szalki Petriego (metoda płytek lanych Kocha) albo do probówek pomiarowych (metoda NPL – najbardziej prawdopodobnej liczby). W przypadku prób cieczy pobierano 1 ml i postępowano analogicznie. Ogólną liczbę mikroorganizmów oznaczano na podłożu stałym, o następującym składzie na 1 litr:

- glukoza – 0,5 g,
- ekstrakt drożdżowy – 0,5 g,
- pepton – 0,5 g,
- enzymatyczny hydrolizat kazeiny – 0,5 g,

- skrobia rozpuszczalna – 0,5 g,
- pirogronian sodu – 0,3 g,
- $K_2HPO_4$  – 0,3 g,
- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  – 0,05 g,
- agar – 15 g,
- pH 7,2.

Ogólną liczbę grzybów oznaczano na stałym podłożu Czapek-Dox. W celu oznaczenia całkowitej liczby mikroorganizmów zdolnych do rozkładu gumy ksantanowej (depolimeryzujących ksantan) stosowano podłoże mineralne według Kijewskiej, pH 7,2. Do podłoża mineralnego dodawano 20 ml roztworu mikroelementów. Izolację mikroorganizmów rozkładających polimer ksantanowy prowadzono na tym samym podłożu. Wyrosłe kolonie przenoszono następnie na takie samo podłoże, lecz płynne, w celu wykluczenia mikroorganizmów wyrosłych na płytkach agarowych (wykorzystujących ewentualne zanieczyszczenia obecne w agarze, względnie pozostałości związków organicznych pochodzących z wysiewanych prób gleby). Mikroorganizmy ponownie przenoszono na podłoże stałe i dokonywano standardowego posiewu redukcyjnego w celu uzyskania czystych szczepów. Posiew redukcyjny powtarzano 3÷7 razy, a wyizolowane w ten sposób szczepy dodawano do banku szczepów INiG. Równolegle wykonywano posiew na podłożu stałym niezawierającym ksantanu, w celu odrzucenia mikroorganizmów – zdolnych również do hydrolizy samego agaru (agar jest także związkiem polisacharydowym). Do dalszych badań kwalifikowano tylko bakterie, natomiast grzyby wykluczano – ze względu na brak możliwości zastosowania ich w warunkach złożowych. Następnie badano cechy przydatne w warunkach złożowych, takie jak: ruchliwość, wzrost w warunkach tlenowych/beztlenowych (zdolność do wzrostu w warunkach beztlenowych badano metodą płytkową Kocha, inkubując mikroorganizmy w pojemniku Anaerostat™ z wkładem do tworzenia atmosfery beztlenowej Anaerocult firmy Merck), w zakresie temperatur 4÷40°C, w szerokim zakresie pH (4÷10) oraz tolerancję stężenia NaCl do 10%.

### Identyfikacja mikroorganizmów

Identyfikację przeprowadzono w następujący sposób:

- Ocenę morfologii mikroorganizmów: kształt i barwę kolonii wyrosłych na podłożu agarowym, a także grzybni grzybów i pseudogrzybni promieniowców. Korzystano z Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [6].
- Techniki mikroskopowe: kształt komórek, ocena ruchliwości, barwienie metodą Grama, Ziehl-Nielsen, barwienie spor metodą Dornera w modyfikacji Sny-

dera, barwienie otoczek (czerwień Kongo + barwnik Maneval'a).

- Badanie cech biochemicznych: katalaza, oksydaza, redukcja azotanów, tworzenie indolu oraz siarkowodoru. Wykonano tylko część niezbędnych oznaczeń, ponieważ rutynowo wykorzystywano dostępne w handlu testy biochemiczne oraz półautomatyczny system Mini API® firmy Biomerieux, znajdujący się na wyposażeniu Zakładu Mikrobiologii INiG. Wykorzystano test ID 32 GN. Jest to wystandaryzowany zestaw do automatycznej identyfikacji pałeczek gram-ujemnych, który wykorzystuje 32 zminiaturyzowane testy asymilacyjne (biochemiczne) i bazę danych. Składa się on z 32 studzienek, z których każda zawiera odwodniony substrat (w większości jest to substrat węglowodanowy). Do półpłynnego, uboższego podłoża nanosi się zawiesinę badanego mikroorganizmu i po 24÷48 godzinach inkubacji wykrywa się wzrost w każdej studzience przy użyciu aparatu miniAPI®. W studzience oznaczonej 1.0 znajduje się L-ramnoza, w studzience 1.1 N-acetyloglukozamina, w studzience 1.2 D-ryboza, w 1.3 inozytol itd. W przypadku pałeczek gram-ujemnych test pozwala na precyzyjną identyfikację szeregu z nich, natomiast w przypadku innych mikroorganizmów jest on przydatny w uzyskaniu profilu cech metabolicznych badanego drobnoustroju.

W celu uzyskania potwierdzenia wyników, dla wyizolowanych mikroorganizmów przeprowadzono sekwencjonowanie genu kodującego 16S rRNA [17]. Badania te zostały wykonane w Centrum Badań DNA, Laboratorium Genetyki Medycznej, ul Mickiewicza 31, 60-835 Poznań. Zastosowano metodę enzymatycznej amplifikacji (PCR-I – ang. *polymerase chain reaction*, czyli reakcji łańcuchowej polimerazy) fragmentów DNA przy użyciu starterów, flankujących ok. 500-nukleotydowy fragment badanego genu i oceniano długość fragmentów DNA na żelu agarozowym. Kolejny etap to enzymatyczna reakcja sekwencjonowania (PCR-II), z wykorzystaniem zestawu do sekwencjonowania BigDye Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Sequencing Kit, firmy Amersham Biosystems. Analizę sekwencjonowania wykonano przy użyciu sekwenatora kapilarnego ABI Prism® 3100 Genetic Analyser. Identyfikacja była możliwa dzięki bazie danych sekwencji 16S rDNA MicroSeq, jak również dzięki programowi BLAST, znajdującemu się na stronie National Center of Biotechnology Information – pod adresem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Uzyskane sekwencje zostały zamieszczone w GenBank i są dostępne pod numerami HQ423409÷HQ423411.

### Ocena zdolności degradowania polimeru ksantanowego

Zdolność degradacji polimerów oceniano inkubując mieszaninę bakteryjną w podłożu zawierającym polimer ksantanowy (3 g/litr). Do ilościowego oznaczenia posłużono się zmodyfikowaną metodą wykorzystującą odczynnik dinitrosalicylowy [8]. Hydroliza tych wiązań pozwala na uwolnienie monomerów i w konsekwencji – ilościowe oznaczenie danego polimeru. Z każdej badanej hodowli pobierano po 1 ml i przesączało przez sączek (w celu usunięcia zanieczyszczeń) do oddzielnych probówek. Następnie dodawano 9 ml 20-proc. kwasu siarkowego i inkubowano w temp. 90°C. Czas hydrolizy wynosił minimum 2 godz. Po tym okresie z każdej probówki pobierano po 0,5 ml hydrolizatu i przenoszono do nowej probówki. Następnie zobojętniano każdą próbkę, przez dodanie niewielkiej objętości stężonego KOH. Do każdej probówki dodawano po 1 ml odczynnika dinitrosalicylowego i inkubowano w łaźni wodnej w temp. 90°C przez kolejne 10 min. Probówki chłodzono, dodawano po 10 ml wody destylowanej i po dokładnym wymieszaniu mierzono absorbancję, przy długości fali 540 nm względem próby ślepej, na spektrofotometrze Marcel Media Eko. Jako standardu użyto roztworu glukozy o stężeniu 1,8 mg/ml, w zakresie 0,5÷5 mM. Przedstawiając wyniki posłużono się arbitralną jednostką „% degradacji”, w celu lepszego odzwierciedlenia faktycznego poziomu rozkładu polimerów. Postąpiono w ten sposób, ponieważ badany związek był produktem o czystości technicznej, zatem ustalenie jego dokładnego stężenia nie jest możliwe jeśli nie dysponuje się – jako standardem – związkiem

o czystości analitycznej i znanej masie cząsteczkowej. Tym niemniej metoda jest bardzo wygodna i pozwala na szybkie oszacowanie stopnia degradacji polimerów. Wyższa wartość oznacza większy stopień degradacji.

### Płuczki wiertnicze

W badaniach wykorzystano dwie płuczki zawierające w swoim składzie polimer ksantanowy (XCD), które obecnie są powszechnie stosowane w wiertnictwie. Skład płuczek był następujący:

- Płuczka nr 1 na bazie skrobi:
  1. Rotomag – 3%,
  2. XCD – 0,2%,
  3. KCl – 5%,
  4. Blokator M-25 – 7%.
- Płuczka nr 2 na bazie celulozy:
  1. Polofix LV – 2%,
  2. XCD – 0,2%,
  3. KCl – 5%,
  4. Blokator M-25 – 7%.

Przed rozpoczęciem badań płuczki poddano sterylizacji, a następnie skażono je wybranymi szczepami mikroorganizmów. Płuczki inkubowano w temperaturze 30°C przez okres 12 tygodni, systematycznie oznaczając ich właściwości reologiczne. Pomiaru właściwości reologicznych prowadzono na sześciopakowym wiskozymetrze Fann UG 35SA. Interpretacji wyników dokonano w oparciu o program komputerowy, przyjmując do obliczeń model reologiczny Bingham.

### Wyniki

W pierwszym etapie badań uzyskano 18 mieszanych kultur mikroorganizmów, posiadających zdolność wykorzystania ksantanu jako jedyne źródła węgla. Ich cechy zebrano w tablicy 2. Kultury te charakteryzowały się wzrostem w warunkach tlenowych i beztlenowych, w zakresie temperatur 30÷50°C (niektóre nawet do 60°C), a większość z nich (13 kultur) tolerowała stężenie NaCl do 10%.

Ponieważ obserwacje mikroskopowe w większości uzyskanych konsorcjów wykazały również obecność grzybów, dalsze postępowanie miało na celu uzyskanie czystych szczepów bakteryjnych. Szczepów takich – wykorzystujących polimer ksantanowy jako jedyne źródło węgla – uzyskano 5 i zasiłły one bank szczepów INIG (oznaczenia odpowiednio IN40÷IN44). Parametry fizjologiczne nie odpowiadały parametrom stwierdzonym dla mieszanych kultur, co sugeruje, że w mieszanych kulturach znajdowały

się także szczepy nie degradujące ksantan, a korzystające z produktów metabolizmu innych mikroorganizmów (względnie, że część stwierdzonych cech należy przypisać grzybom). Wyizolowane szczepy wykazywały wzrost w zakresie pH 6÷9 (4 szczepy) i 5÷9 (1 szczep), (tablica 3). Jeśli chodzi o zakres temperaturowy, są to typowe szczepy mezofilne, z optimum wzrostu 20÷30°C, choć były one także zdolne do wzrostu w szerszym zakresie temperatur. Z kolei tylko 1 szczep wykazywał wzrost w 3% NaCl, a dla pozostałych stężenie 1% stanowiło górną granicę. Wykonane badania identyfikacyjne pozwoliły zakwalifikować 2 szczepy (IN40 i IN41) do rodzaju *Bacillus* (a po dalszych analizach do rodzaju *Paenibacillus*), zaś 3 kolejne (IN42÷IN44) – do rodzaju *Sphingobacterium*. Dokładne charakterystyki wyizolowanych szczepów przedstawiono w tablicy 3, przy czym uwzględniono tylko charakterystyki

Tablica 2. Charakterystyka kultur mikroorganizmów wyizolowanych z różnych źródeł

Kultura	Miejsce izolacji	Wzrost tlenowy/ beztlenowy	Wzrost 50/60°C	Ruchliwość	Tolerancja NaCl do 10%	Maksymalna liczba mikroorganizmów w 1 ml (jtk.)
A	Woda złożowa	+/+	+/-	+	+	$6,1 \cdot 10^5$
B	Woda złożowa	+/+	+/-	+	+	$4,7 \cdot 10^5$
C	Woda złożowa	+/+	+/-	+	+	$4,2 \cdot 10^6$
D	Woda złożowa	+/+	+/-	+	+	$3,8 \cdot 10^6$
E	Woda złożowa	+/+	+/+	+	+	$5,1 \cdot 10^6$
F	Dół urobkowy	+/+	+/-	+	+	$1,4 \cdot 10^7$
G	Dół urobkowy	+/+	+/+	+	+	$7,5 \cdot 10^7$
H	Dół urobkowy	+/+	+/+	+	+	$8,9 \cdot 10^6$
I	Dół urobkowy	+/+	+/-	+	+	$8,3 \cdot 10^6$
J	Dół urobkowy	+/+	+/-	+	-	$2,2 \cdot 10^5$
K	Składowisko Krasnobród	+/+	+/+	+	+	$5,8 \cdot 10^7$
L	Składowisko Krasnobród	+/+	+/-	+	+	$2,6 \cdot 10^6$
M	Składowisko Krasnobród	+/+	+/+	+	+	$7,7 \cdot 10^6$
N	Składowisko Krasnobród	+/+	+/-	+	-	$9,1 \cdot 10^6$
O	Kopalnia Wieliczka	+/+	+/-	+	+	$1,9 \cdot 10^7$
P	Gleba	+/+	+/-	+	-	$6,3 \cdot 10^6$
R	Gleba	+/+	+/-	+	-	$5,4 \cdot 10^6$
S	Gleba	+/+	+/-	+	-	$4,9 \cdot 10^5$

„+” efekt pozytywny, „-” efekt negatywny, jtk. – jednostki tworzące kolonie

Tablica 3. Charakterystyka wyizolowanych szczepów bakteryjnych

Cecha badana	<i>Paenibacillus</i> sp. IN40	<i>Paenibacillus</i> sp. IN41	<i>Sphingobacterium</i> sp. IN42	<i>Sphingobacterium</i> sp. IN43
Barwienie Grama	+	+	-	-
Wzrost tlenowy	+	+	+	+
Wzrost beztlenowy	+	+	-	-
Ruchliwość	+	+	-	-
Kształt	pałeczki	pałeczki	pałeczki	pałeczki
Tworzenie przetrwalników	+	+	-	-
Tworzenie indolu	-	-	-	-
pH	6÷9	6÷9	6÷9	5÷9
4/22/30/37/40 [°C]	+/+/+/-	-/+/+/-	+/+/+/-	+/+/+/-
Tolerancja NaCl [%]	0,1÷1	0,1÷1	0,1÷3	0,1÷1
Katalaza	+	+	+	+
Oksydaza	-	-	+	+
$\beta$ -Galaktozydaza	+	+	+	+
$\alpha$ -Glukozydaza	+	+	+	+
L-Ramnoza	-	-	-	-

cd. Tablica 3.

Cecha badana	<i>Paenibacillus</i> sp. IN40	<i>Paenibacillus</i> sp. IN41	<i>Sphingobacterium</i> sp. IN42	<i>Sphingobacterium</i> sp. IN43
N-acetyloglukozamina	+	+	+	+
D-Ryboza	-	-	-	-
Inozytol	-	-	-	-
Sacharoza	+	+	-	+
D-Maltoza	+	+	+	+
Kwas itakonowy	+	+	+	+
Kwas suberynowy	+	+	+	+
Malonian sodu	+	-	-	-
Octan sodu	+	+	+	+
Kwas mlekowy	+	+	+	+
L-Alanina	+	+	+	+
5-Ketoglukonian potasu	-	-	-	-
Glikogen	+	+	-	-
Kwas 3-hydroksybenzoesowy	-	-	-	-
L-Seryna	+	-	+	+
D-Mannitol	+	-	-	-
D-Glukoza	+	+	+	+
Salicyna	+	+	-	+
D-Melibioza	+	+	-	+
L-Fukoza	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-
L-Arabinoza	-	-	-	+
D-Mannoza	+	+	+	+
Kwas propionowy	+	+	+	+
Kwas dekanowy	+	+	+	+
Kwas walerianowy	+	+	+	+
Cytrynian trójsodowy	+	+	+	+
L-Histydyna	+	+	+	+
2-Ketoglukonian potasu	-	-	-	-
Kwas 3-hydroksymasłowy	+	+	-	+
Kwas 4-hydroksybenzoesowy	+	-	-	-
L-Prolina	+	+	+	+
Agar	-	-	-	-

„+” oznacza efekt pozytywny, „-” efekt negatywny. Substraty wymienione w tablicy służyły jako jedyne źródło węgla i/lub azotu. Większość wyników otrzymano na podstawie testu API 32 GN firmy Biomerieux.

czterech z nich, jako że dla szczepów IN42 i IN44 różnica wystąpiła tylko w jednej ze wszystkich analizowanych cech, co sugeruje, że szczepy te mogą reprezentować ten sam gatunek.

Ostatnim testem było badanie stopnia degradacji polimeru. Spośród testowanych próbek tylko szczep IN41 był w stanie samodzielnie zdegradować polimer (98,7%

degradacji – tablica 4). Dla pozostałych szczepów uzyskane wartości nie przekraczały 30%, co sugeruje, że degradacji ulegały wyłącznie łańcuchy boczne, a nie rdzeń polimeru. Tezę tę potwierdza fakt, że mieszana kultura (konsorcjum), oznaczona „K”, była zdolna do degradowania całego polimeru, a więc zawierała mikroorganizmy atakujące łańcuch główny, po usunięciu chroniących go łańcuchów bocznych.

Tablica 4. Zdolność wyizolowanych mikroorganizmów do degradowania polimeru ksantanowego

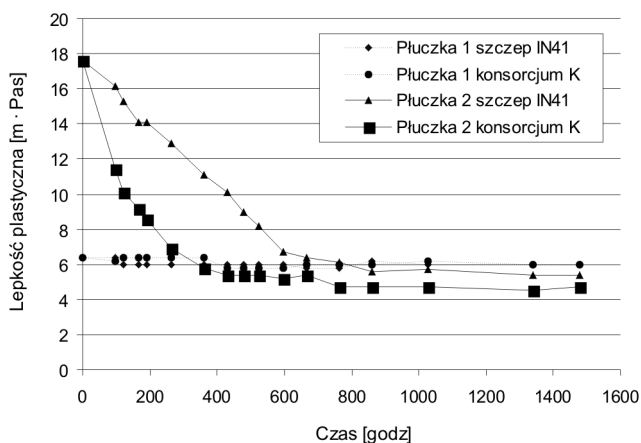
Wyizolowany szczep/kultura	Procent degradacji
<i>Paenibacillus sp.</i> IN40	26,4 (24,1÷29,7)
<i>Paenibacillus sp.</i> IN41	98,7 (97,5÷99,2)
<i>Sphingobacterium sp.</i> IN42	27,6 (24,5÷30,1)
<i>Sphingobacterium sp.</i> IN43	27,2 (23,9÷31,6)
<i>Sphingobacterium sp.</i> IN44	29,3 (25,4÷31,9)
K (konsorcjum)	99,1 (97,5÷99,6)

W kolejnym etapie badań analizowano wpływ mikroorganizmów na płuczki wiertnicze. Do badań wykorzystano *Paenibacillus sp.* – szczep IN41 oraz konsorcjum K. Wykonane badania wykazały różnice, wyrażone lepkością plastyczną i wytrzymałością strukturalną, jeśli chodzi o oba rodzaje płuczek. Uzyskane wyniki wskazują, że płuczka

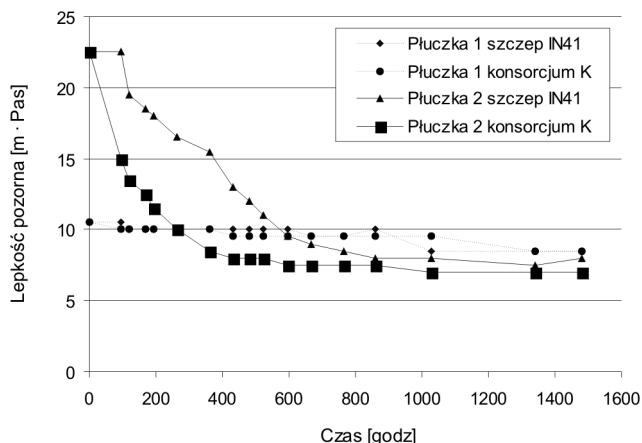
nr 2 podlegała całkowitej biodegradacji (rysunek 1), natomiast płuczka nr 1 – tylko w relatywnie niewielkim stopniu. Nie zaobserwowano zasadniczych różnic pomiędzy działaniem szczepu IN41 oraz konsorcjum K (rysunki 2–5).



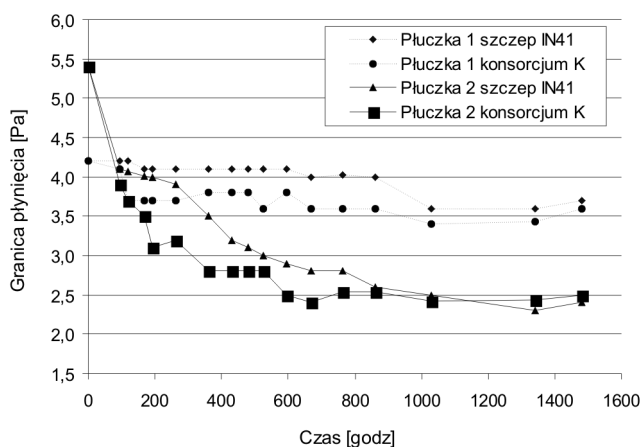
Rys. 1. Płuczka nr 2 po sześciu tygodniach. Widoczne całkowite zniszczenie struktury płuczki oraz różnice w lepkości pomiędzy poszczególnymi próbkami (front „płynięcia” zatrzymuje się w innym miejscu)



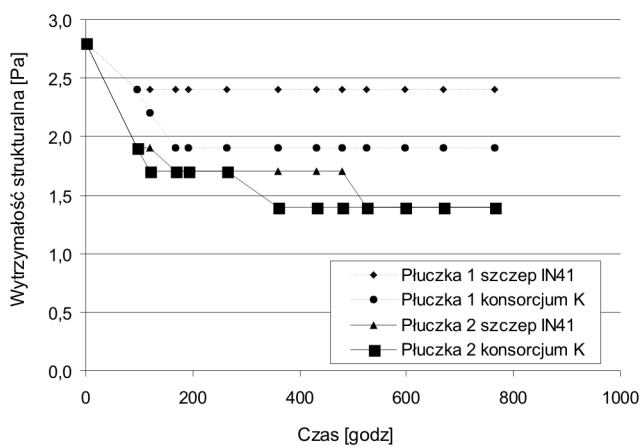
Rys. 2. Zmiany lepkości plastycznej płuczek ksantanowych pod wpływem działania mikroorganizmów



Rys. 3. Zmiany lepkości pozornej płuczek ksantanowych pod wpływem działania mikroorganizmów



Rys. 4. Zmiany granicy płynięcia płuczek ksantanowych pod wpływem działania mikroorganizmów



Rys. 5. Zmiany wytrzymałości strukturalnej płuczek ksantanowych pod wpływem działania mikroorganizmów

## Dyskusja

W ogólnym zarysie degradacja polimerów sacharydowych polega na depolimeryzacji, tzn. rozerwaniu wiązań glikozydowych pomiędzy poszczególnymi monomerami. W przypadku ksantanu, skuteczne są 3 mechanizmy degradacji: kwaśna hydroliza, hydroliza oksydacyjno-redukcyjna oraz biodegradacja. W badaniach nad kwaśną hydrolizą wykazano odporność ksantanu na działanie słabych kwasów. W zakresie pH 1÷4 najbardziej labilne okazuje się wiązanie pomiędzy terminalną resztą mannozy, a kwasem glukuronowym. Pozostałe wiązania są bardziej stabilne, a szczególnie trwale okazują się te wewnątrz rdzenia, łączące monomery glukozy (tempo hydrolizy jest ok. 10-krotnie wolniejsze). Mechanizm oksydacyjno-redukcyjny (hydroliza polimeru w obecności czynnika redukcyjnego i tlenu cząsteczkowego) polega na tworzeniu wolnego rodnika, atakującego łańcuch. Mechanizm ten jest skuteczniejszy, ponieważ prowadzi do rozpadu całego łańcucha w jednakowym tempie. Trzeci mechanizm to mechanizm biologiczny, polegający na hydrolizie enzymatycznej. Wykazano, że celulazy (enzymy odpowiedzialne za hydrolizę celulozy) potrafią w pewnym stopniu atakować wiązanie  $\beta$ -1,4, przy czym hydroliza odbywa się w sposób przypadkowy. Z całą pewnością łańcuchy boczne utrudniają zadanie celulazom, dlatego efekt samodzielnego działania tych enzymów jest relatywnie słaby [2]. Do pełnego rozkładu polimeru potrzeba więc kilku enzymów. Nankai i in. [10] podali schemat enzymatycznej degradacji ksantanu. W procesie tym muszą uczestniczyć: liaza ksantanowa (usuwa terminalną mannozę),  $\beta$ -D-glukanaza (endocelulaza – hydrolizuje niektóre wiązania  $\beta$ -1,4 wewnątrz cząsteczki ksantanu),  $\beta$ -D-glukozydaza (hydrolizuje wiązanie pomiędzy dwiema resztami glukozy), hydrolaza glukuronolowa (wiązanie pomiędzy kwasem glukuronowym i wewnętrzną mannozą) oraz  $\alpha$ -mannozydaza (wiązanie  $\alpha$ -1,3). Jak widać, jest to system dość złożony. Stąd też bierze się odporność polimeru ksantanowego na biodegradację, jako że istnieje niewiele mikroorganizmów posiadających wszystkie niezbędne enzymy.

Technologie mikrobiologiczne znajdują coraz szersze zastosowanie w przemyśle naftowym. Rutynowo stosowane są technologie wspomagające eksploatację ropy naftowej [11] i usuwające zanieczyszczenia środowiskowe [13]. Szerokie zdolności mikroorganizmów do degradowania polisacharydów [16] dają szansę na podobne zastosowanie jeśli chodzi o usuwanie uszkodzeń strefy przyodwiertowej. Np. firma Micro-Bac International ma w swojej ofercie dwa bioprodukty przeznaczone do degradowania polimerów polisacharydowych: Frac-Bac – degradujący polimery

skrobiowe i celulozowe oraz Gum-Bac – przeznaczony do usuwania uszkodzeń spowodowanych gumą guarową. Nie istnieje natomiast produkt, który z powodzeniem można zastosować do rozkładu polimerów ksantanowych, choć opisano już przykład pozytywnego zastosowania biotechnologii w usuwaniu uszkodzeń spowodowanych przez polimer ksantanowy [14]. Wynika to z faktu (co zostało wykazane w niniejszej pracy), że jest problem z uzyskaniem mikroorganizmów o zadawalających cechach. Dotyczy to przede wszystkim optymalnej temperatury działania, która w przypadku biopreparatów stosowanych w złożu powinna zawierać się w przedziale 30÷50°C, a temperatura suboptymalna powinna znacznie wykraczać poza ten przedział. Dla wyizolowanych mikroorganizmów optimum temperaturowe znajdowało się w przedziale 20÷30°C. Drugą sprawą jest tolerancja wyższych stężeń soli; wstępne wyniki wskazywały na to, że udało się otrzymać mikroorganizmy tolerujące stężenie soli do 10%, podczas gdy wyizolowane szczepy nie posiadały tej cechy. Najprawdopodobniej mieszane kultury zawierały mikroorganizmy tolerujące wysokie stężenia soli, które korzystały z produktów metabolizmu szczepów degradujących ksantan. Inna możliwość to obecność grzybów, które charakteryzowały się wysoką zdolnością rozkładu ksantanu, zostały jednak odrzucone ze względu na brak możliwości zastosowania w warunkach złożowych. Z drugiej strony należy zwrócić uwagę na stosunkowo szeroki zakres akceptowanego odczynu środowiska. Choć optimum dla wszystkich wyizolowanych szczepów oscyluje w okolicach pH 7, to jednak zdolności tolerowania rozmaitego pH (dla jednego szczepu nawet 5÷9) należy uznać za wystarczające. Większym kłopotem może być fakt, że 3 z pięciu wyizolowanych mikroorganizmów są tlenowcami, co może poważnie utrudniać ich działanie w środowisku złożowym. Należy jednak pamiętać, że zawsze pewna ilość tlenu jest rozpuszczona w wodzie przeznaczonej do sporządzenia cieczy zabiegowej i może to być wystarczające stężenie dla rozwoju mikroorganizmów. Poza tym wyizolowane szczepy można także zastosować razem innymi, zdolnymi do działania w warunkach beztlenowych. Ostatni problem (być może najważniejszy) dotyczy zdolności degradowania cząsteczki ksantanu do momentu, w którym traci ona swoje właściwości – co objawia się klarowaniem roztworu i spadkiem jego lepkości. Spośród pięciu otrzymanych szczepów tylko jeden charakteryzował się samodzielną zdolnością degradowania całej cząsteczki ksantanu. Pozostałe degradowały ksantan tylko do pewnego stopnia i w sposób niewystarczający do zaobserwowania



wymaganych zmian. Co istotne, pełna degradacja występowała w mieszanej kulturze (konsorcjum K); oznacza to, że współdziałanie kilku mikroorganizmów jest wskazane. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [12], w których mowa była o tym, że wiele mikroorganizmów ma zdolność hydrolizowania tylko jednego typu wiązania w cząsteczce ksantanu i dotyczy to łańcuchów bocznych. Ze względu na fakt, że łańcuchy boczne pełnią funkcję ochronną i stabilizującą całej cząsteczki, ich degradacja (a często już usunięcie terminalnej reszty mannozy) powoduje odsłonięcie wiązań  $\beta$ -1,4-glikozydowych łańcucha głównego (rdzenia), przez co cała cząsteczka ksantanu staje się podatna na działanie enzymów. Wykazano różnice co do wpływu mikroorganizmów jeśli chodzi o oba rodzaje płuczek, przy czym należy zwrócić uwagę, że znaczące zmiany parametrów następowały w płuczce numer 2, a więc tej, której składnikiem (obok polimeru ksantanowego) był polimer celulozowy. W cząsteczce celulozy podstawowym wiązaniem jest wiązanie  $\beta$ -1,4-glikozydowe, czyli to samo, które jest odpowiedzialne za tworzenie rdzenia

cząsteczki ksantanu. Innymi słowy, mikroorganizmy zdolne do degradacji ksantanu są w stanie również degradować celulozę. Płuczka numer 1 była płuczką skrobiową i nie obserwowano w niej istotnych zmian. Uzyskano równocześnie potwierdzenie, że otrzymane mikroorganizmy są w stanie wykazywać aktywność w środowisku płuczki wiertniczej. Wydaje się więc najbardziej logiczne, aby wyizolowane szczepy dołączyć do posiadanego własnego biopreparatu INiG (względnie komercyjnych preparatów Frac-Bac i Gum-Bac), a następnie przeprowadzić badania nad degradacją płuczek wiertniczych oraz usuwaniem uszkodzeń strefy przyodwiertowej na rdzeniach piaskowcowych w warunkach otworopodobnych.

Na zakończenie należy podkreślić, że sam fakt uzyskania pięciu czystych szczepów zdolnych do rozkładu polimeru ksantanowego można uznać za sukces. Dwa z nich zaliczały się do rodzaju *Paenibacillus*, którego przedstawiciele byli opisani jako zdolni do atakowania polimeru ksantanowego [9, 12], podczas gdy pozostałe trzy zaliczały się do rodzaju *Sphingobacterium*, co jest nowością.

Artykuł nadesłano do Redakcji 26.10.2010 r. Przyjęto do druku 13.01.2011 r.

Recenzent: prof. dr hab. inż. Józef Raczkowski

## Literatura

- [1] Becker A., Katzen F., Puhler A., Ielpi L.: *Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 50, 145–152, 1998.
- [2] Christensen B.E., Smidsrod O., Stokke B.T.: *Xanthan, depolymerization*. [w] Polymeric Materials Encyclopedia, vol. 11, Joseph C. Salamone, Bausch & Lomb, Rochester, New York, USA, CRC Press, 1996.
- [3] Falkowicz S., Kapusta P.: *Biological control of formation damage*. SPE International Symposium and Exhibition on Formation Damage Control held in Lafayette, Louisiana, 20–21 February 2002, SPE Paper 73792.
- [4] Garcia-Ochoa F., Santos V.E., Casas J.E., Gomez E.: *Xanthan gum: production, recovery and properties*. Biotechnol. Adv., 18, 549–579, 2000.
- [5] Glazer A.N., Nikaido H.: *Microbial biotechnology. Fundamentals of applied microbiology*. Second edition. Cambridge University Press Cambridge 32 Avenue of the Americas, New York, NY 10013-2473, USA, 2007.
- [6] Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T.: *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ninth edition. Williams & Wilkins 428 East Preston Street Baltimore, Maryland 21202, USA, 1994.
- [7] Kaszycki P., Szumilas P., Kołoczek H.: *Biopreparat przeznaczony do likwidacji środowiskowych skażeń węglowodorami i ich pochodnymi*. [w] Inżynieria Ekologiczna nr 4 „Biopreparaty w ochronie i użytkowaniu środowiska, Ochrona i rekultywacja gruntów”, 2001.
- [8] Miller G.L.: *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Anal. Chem., 31, 426–428, 1959.
- [9] Muchova M., Ruzicka J., Julinova M., Dolezalova M., Houser J., Koutny M., Bunkova L.: *Xanthan and gellan degradation by bacteria of activated sludge*. Water Sci. Technol., 60, 965–973, 2009.
- [10] Nankai H., Hashimoto W., Murata K.: *Molecular identification of family 38 – mannosidase of Bacillus sp. strain GLL, responsible for complete depolymerization of xanthan*. Appl. Environ. Microbiol., 68, 2731–2736, 2002.
- [11] Portwood J.T.: *A Commercial microbial enhanced oil recovery technology: evaluation of 322 projects*. SPE Paper 29518, 1995.
- [12] Ruijsenaars H.J., de Bont J.A.M., Hartmans S.: *A pyruvated mannose-specific xanthan lyase involved in xanthan degradation by Paenibacillus alginolyticus XL-1*. Appl. Environ. Microbiol., 65, 2446–2452, 1999.
- [13] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz T.: *Effectiveness of bioremediation processes of hydrocarbon pollutants in weathered drill wastes*. Water Air Soil Pollut., 202, 211–228, 2009.
- [14] Tjonjoepin R.M., Beall B.B., Brannon H.D.: *Biotechnological treatment removes xanthan based skin damage*. SPE 38162, 1997.
- [15] Uliasz M., Chudoba J.: *Polimery organiczne stosowane w technologii płuczki*. Nafta-Gaz, 56, 174–180, 2000.
- [16] Warren R.A.J.: *Microbial hydrolysis of polysaccharides*. Ann. Rev. Microbiol., 50, 183–212, 1996.
- [17] Weisburg W.G., Bams S.M., Pelletier D.A., Lane D.J.: *16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J. Bacteriol., 173, 679–703, 1991.



Mgr Joanna BRZESZCZ – absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Specjalizacja: chemia biologiczna, synteza organiczna. Odbyła staż naukowy na Uniwersytecie Orleans we Francji oraz uczestniczyła w krajowych i zagranicznych konferencjach naukowo-technicznych i seminariach.

Dr inż. Sławomir FALKOWICZ – absolwent AGH w Krakowie. Obecnie zatrudniony na stanowisku adiunkta w Zakładzie Inżynierii Naftowej INiG w Krakowie. Autor i współautor wielu publikacji krajowych i zagranicznych, opracowań przemysłowych, patentów oraz wdrożeń. Obecnie specjalizuje się w ocenie niektórych właściwości skał zbiornikowych oraz w projektowaniu zabiegów mikrobiologicznej obróbki odwiertów i stymulacji złóż ropy naftowej.



Dr Anna TURKIEWICZ – absolwentka Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego. Adiunkt w Instytucie Nafty i Gazu w Krakowie, kierownik techniczny Zakładu Mikrobiologii INiG. Autorka ok. 50 publikacji naukowych, w tym patentów z zakresu PMG. Specjalizacja: mikrobiologia płynów złożowych i biodegradacja płynów wiertniczych.



Dr Piotr KAPUSTA – absolwent Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego. Adiunkt w Instytucie Nafty i Gazu, kierownik Zakładu Mikrobiologii INiG. Zainteresowania badawcze: bioremediacja, mikrobiologia złóż ropy naftowej i gazu ziemnego.

## Oferta



### ZAKŁAD MIKROBIOLOGII (SM)

Kierownik: dr Piotr Kapusta

31-503 Kraków, ul. Lubicz 25A  
tel.: +48 12 421 00 33 wew. 265  
fax: +48 12 430 38 85  
e-mail: piotr.kapusta@inig.pl

#### Zakres działania:

- badania procesów mikrobiologicznych w środowisku złożowym podziemnych magazynów gazu ziemnego (PMG),
- działania prewencyjne – zastosowanie biocydów, środków typu H<sub>2</sub>S Scavenger oraz inhibitorów bakterii SRB i biogenego H<sub>2</sub>S,
- bioremediacja gruntów skażonych związkami ropopochodnymi,
- biodegradacja związków polimerowych wchodzących w skład płynów wiertniczych,
- mikrobiologiczne technologie stymulacji eksploatacji złóż węglowodorów,
- mikrobiologiczne metody poszukiwawcze: metodą powierzchniową oraz mikrobiologicznego profilowania odwiertów,
- badania testowe preparatów antybakteryjnych (biocydów),
- badania bakteriologiczne wody pitnej.

**INSTYTUT NAFTY I GAZU**  
ul. Lubicz 25A, 31-503 Kraków  
tel.: +48 12 421 00 33 fax: +48 12 430 38 85  
www.inig.pl office@inig.pl

KRS 0000075478, REGON 000023136, NIP 675-000-12-77