

**Biosurfaktanty otrzymywane z endofitycznych bakterii wyizolowanych z
Chelidonium majus L. – produkcja i zastosowanie**

Mgr inż. Piotr Drożdżyński

Promotor dr hab. inż. Olga Marchut-Mikołajczyk

Streszczenie

Ciągły rozwój cywilizacyjny, obok niewątpliwych korzyści związanych z wytwarzaniem użytecznych produktów, generuje także duże ilości odpadów, których zagospodarowanie stanowi jedną z podstaw gospodarki cyrkularnej. Rozwiązaniem problemu zanieczyszczenia środowiska jak również gospodarki odpadami może być wykorzystanie sprawnych biologicznych narzędzi, takich jak mikroorganizmy. Analiza danych literaturowych dotyczących poszukiwania nowych drobnoustrojów mogących stanowić źródło innowacyjnych związków biologicznie aktywnych jak również skuteczne narzędzie w walce z zanieczyszczeniem środowiska stała się inspiracją do podjęcia badań nad szczególną grupą drobnoustrojów – mikroorganizmami endofitycznymi.

Przedmiotem badań było opracowanie biosyntezy związków powierzchniowo czynnych przez bakterie endofityczne (wyizolowane z rośliny *Chelidonium majus* L.) na surowcach odpadowych i półproduktach przemysłu rolno-spożywczego; charakterystyka budowy i właściwości pozyskanych biosurfaktantów; ich zastosowanie jako związków promujących wzrost roślin oraz czynników wspomagających mikrobiologiczną degradację związków węglowodorowych.

W ramach niniejszej pracy opracowano warunki powierzchniowej sterylizacji materiału roślinnego, niezbędnej do przeprowadzenia izolacji mikroorganizmów endofitycznych (czas sterylizacji oraz stężenie dezynfektanta). Wyizolowano szesnaście szczepów mikroorganizmów endofitycznych (10 szczepów bakterii i 6 szczepów grzybów). Izolaty poddano skринingowi pod kątem zdolności do produkcji związków powierzchniowo czynnych oraz wysokiej aktywności degradacyjnej, w wyniku której wytypowano dwa szczepy bakteryjne (2A i EN18) spełniające powyższe warunki.

Istotnym było określenie przynależności taksonomicznej wybranych izolatów, która wykonana została na podstawie identyfikacji podjednostek 16S rRNA. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzonej analizy określono przynależność gatunkową szczepów 2A i EN18 do grupy bakterii *Bacillus pumilus* oraz *Bacillus cereus* (z uwagi na potencjalną patogenność, prace nad szczepem EN18 zaniechano).

Jednym z najważniejszych i jednocześnie najtrudniejszych etapów procesu biotechnologicznego jest określenie optymalnych warunków biosyntezy. Realizując cele niniejszej pracy, wykorzystując analizę statystyczną (metoda Taguchi) określono warunki (substrat, temperaturę, pH, stężenie inokulum) biosyntezy biosurfaktanta przez endofityczny szczep *Bacillus pumilus* 2A. Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz określono optymalne warunki procesu: źródło węgla - młóto browarniane, źródło azotu – azotan amonu, temperatura 30°C, pH 7, stężenie inokulum 5%. Opracowane warunki biosyntezy pozwoliły na przeprowadzenie procesu w skali ćwierć-technicznej w fermentorze Infors Techfors (30 litrów), z wydajnością 8,68 g/l związku powierzchniowo czynnego.

Określono również skład oraz właściwości biosurfaktanta produkowanego przez szczep 2A. Wykonane analizy biochemiczne, spektrometryczne oraz chromatograficzne wykazały, że jest to glikolipid składający się z kwasów heksadekanowego oraz oktadekanowego, a także zawierający resztę kwasu 9,12-oktadekadienowego. Części hydrofilowe zawierały w swoim składzie reszty D glukozy, D-ksylozy oraz D-arabinozy.

W ramach pracy przeprowadzono analizy właściwości uzyskanego biosurfaktanta, niewątpliwie wpływającego na jego potencjalne zastosowanie. Otrzymany glikolipid charakteryzował się dobrymi właściwościami rozpraszającymi związki hydrofobowe, wysoką termostabilnością, tworzył stabilne emulsje. Ustalono również, że stężenie 1 mg/ml glikolipidu skutkuje inhibicją adhezji bakterii gram dodatnich i gram ujemnych do powierzchni ceramicznych odpowiednio w 67 i 78%, oraz stężenie 2,5 mg/ml redukuje adhezję tych bakterii średnio o 50% w przypadku powierzchni polistyrenowej. Właściwości te mogą predysponować otrzymany glikolipid do aplikacji w różnych gałęziach przemysłu spożywczego do ochrony powierzchni przed patogenami.

Novum w przeprowadzonych badaniach było wykazanie wpływu endofitycznego glikolipidu na wzrost roślin jadalnych. Wykazano, że 0,2% stężenie tego związku skutkuje czterokrotnym zwiększeniem wzrostu fasoli i rzodkiewki, oraz dwukrotnym zwiększeniem wzrostu buraka ćwikłowego, predysponując otrzymany glikolipid do aplikacji w rolnictwie. Wyniki analiz przeprowadzonych na glebie zanieczyszczonej węglowodorami wykazały, że dodatek glikolipidu skutkował również znaczącą poprawą wzrostu roślin wskaźnikowych, niezwykle wrażliwych na skażenie, średnio czterokrotnie.

W ramach pracy zbadano również wpływ otrzymanego związku powierzchniowo czynnego na mikrobiologiczną degradację węglowodorów. Biosurfaktant wprowadzano do gleby zanieczyszczonej różnymi węglowodorami w stężeniu 10 mg/ml (ON, POS, SMAR, KREOZOT) w celu wspomaganie ich biodegradacji z wykorzystaniem szczepu 2A, dzięki czemu efektywność procesu wzrosła o 56% w przypadku ON, trzykrotnie w przypadku POS, dwukrotnie w przypadku SMAR, trzykrotnie w przypadku KREOZOT. Również ubytek węglowodorów aromatycznych w próbach zasilanych otrzymanym związkiem powierzchniowo czynnym był wyższy średnio o 60% dla ON, dwukrotnie wyższy dla POS, 35% dla SMAR oraz 60% dla KREOZOT.

W procesach mikrobiologicznego oczyszczania środowiska niezwykle istotna jest aktywność metaboliczna drobnoustrojów w zanieczyszczonym środowisku. Na podstawie analiz zmian parametrów biochemicznych wykazano znaczącą poprawę aktywności metabolicznej drobnoustrojów w próbach wspomaganych endofitycznym glikolipidem oraz redukcję toksyczności środowiska glebowego (aktywność katalazy średnio na poziomie 350 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{min}$ dla ON i POS, 278 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{min}$ dla SMAR i 82 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g}\cdot\text{min}$ dla KREOZOT). W próbach niewspomaganych dodatkiem glikolipidu aktywność katalazy była 1,5 razy wyższa.

Sam szczep *Bacillus pumilus* 2A, dzięki wysokiej aktywności degradacyjnej, został użyty jako biopreparat podczas oczyszczania gruntu zanieczyszczonego olejem kreozotowym *in situ* na terenie Nasycalni Podkładów S.A. w Koźminie Wielkopolskim w ramach projektu POIR.04.01.02-00-0057/17-00 – „Nowoczesna technologia bioremediacji gruntów zanieczyszczonych olejem kreozotowym na terenie Nasycalni Podkładów Spółka Akcyjna w Koźminie Wielkopolskim”.

W ramach pracy porównano również wpływ syntetycznego surfaktanta (SDS) i biosurfaktanta produkowanego przez szczep 2A na aktywność metaboliczną drobnoustrojów, efektywność degradacji oraz redukcję toksyczności (objawiającą się w intensyfikacji wzrostu roślin wskaźnikowych). W przypadku dodatku syntetycznego surfaktanta nie zaobserwowano zmian badanych parametrów, natomiast potwierdzono pozytywny wpływ dodatku glikolipidu do prób skutkujący wyższą aktywnością metaboliczną, redukcją stężenia zanieczyszczenia (w tym WWA) oraz spadkiem toksyczności.

Uzyskany w ramach pracy endofityczny biosurfaktant może mieć szerokie zastosowanie zarówno w rolnictwie do wspomagania wzrostu roślin, redukując przy tym zastosowanie chemicznych nawozów, w przemyśle spożywczym do ochrony powierzchni przed bakteriami, jak i w ochronie środowiska do degradacji węglowodorów i jednocześnie rekultywacji gleby w celu jej ponownego zagospodarowania. Dodatkowo możliwość produkcji glikolipidu na odpadach przemysłu browarniczego pozwala zagospodarować odpad po produkcji piwa, co wpisuje technologię w ramy gospodarki obiegu zamkniętego.