

JAROSŁAW MAZURKIEWICZ, EWA KISIELEWSKA

## POSZUKIWANIE SZCZEPÓW BAKTERII Z RODZAJU *BACILLUS* PRODUKUJĄCYCH ZWIĄZKI POWIERZCHNIOWO CZYNNY

### Streszczenie

Badano aktywność powierzchniową związków wytworzonych przez szczepy bakterii z rodz. *Bacillus* wyizolowane z gleby nasyconej olejami napędowymi i technicznymi. Przeprowadzono identyfikację szczepów i wykonano pomiar napięcia powierzchniowego płynów pochodzących. Dla porównania aktywności powierzchniowej wykorzystano szczepy bakterii z rodz. *Bacillus* pochodzące z kolekcji Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa. Najlepszy szczep zmniejszył napięcie powierzchniowe żywności o 23.6 % z 69.85 do 53.35 mN/m

### Wstęp

Zjawiskiem wytwarzania przez mikroorganizmy aktywnych powierzchniowo składników (tzw. biosurfaktantów) nauka zajmuje się od ponad pięćdziesięciu lat. W trakcie wieloletnich badań zidentyfikowano trzy główne typy biosurfaktantów: glikolipidy, lipopeptydy i fosfolipidy. Fosfolipidy obecne są we wszystkich organizmach, ale rzadko wydzielane są na zewnątrz organizmu. Natomiast glikolipidy i lipopeptydy wytwarzane przez różne mikroorganizmy są wydzielane w dużych ilościach do środowiska hodowlanego. Istnieje wiele teorii tłumaczących wydzielanie biosurfaktantów do środowiska, ale ich funkcja biologiczna nie jest jeszcze dokładnie poznana.

Biosurfaktanty obejmują grupę powierzchniowo czynnych cząsteczek produkowanych przez żywe komórki, głównie drobnoustroje w czasie ich wzrostu. Pełnią one pewne fizjologiczne funkcje, a mianowicie, umożliwiają mikroorganizmom wzrost na substratach nie mieszających się z wodą, przez zmniejszenie napięcia powierzchniowego na granicy dwóch faz, co prowadzi do wytworzenia emulsji i ułatwia wykorzystanie tychże substratów [8].

Cząsteczka biosurfaktanta zawiera hydrofobową grupę składającą się z tłuszczowego łańcucha węglowodorowego i hydrofilową grupę, która może zawierać estrową lub alkoholową grupę funkcyjną tłuszczów, karboksylową grupę kwasów tłuszczo-

wych lub aminokwasów, grupy fosforanowe zawarte w fosfolipidach lub węglowodanową część glikolipidów [8].

Wzrastające zainteresowanie ewentualnym zastosowaniem substancji powierzchniowo czynnych produkowanych przez mikroorganizmy wynika z ich różnorodnych właściwości funkcyjnych takich jak: emulgacja, de-emulgacja, zwilżanie, redukowanie lepkości, separacja fazowa, zapobieganie korozji. Mogą one być i są już wykorzystywane na skalę przemysłową. W przemyśle naftowym wykorzystano biosurfaktanty do mikrobiologicznego podwyższania stopnia odzysku oleju ze źródeł ropotwórczych (metoda MEOR i EOR) [2, 8, 10].

Biosurfaktanty mogą być wykorzystane w przemyśle kosmetycznym do produkcji szamponów, kremów nawilżających i ochronnych. (np. produkowane przez *Torulopsis bombicola*) [3]. Biosurfaktanty mogą zastąpić surfaktanty pochodzenia chemicznego w rolnictwie i wielu gałęziach przemysłu: spożywczym, farmaceutycznym, a także w budownictwie [8]. Zastosowanie biosurfaktantów zmniejszyłoby znacznie stopień zanieczyszczenia środowiska. Związki te, ze względu na ich łatwą biodegradację i możliwość wykorzystania produktów ubocznych jako surowca, mogłyby zastąpić chemiczne komponenty.

Celem niniejszej pracy było wyizolowanie z próbek glebowych szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*. przeprowadzenie taksonomii fizjologicznej pozwalającej na określenie gatunku wyizolowanych szczepów oraz określenie aktywności powierzchniowo czynnej związków pochodzących ze szczepów wyizolowanych z gleby i z Kolekcji Katedry

## **Material i metody**

Materiałem do izolacji mikroorganizmów przetrwalnikujących tlenowych należących do rodziny *Bacillaceae* były próbki glebowe pobrane w pobliżu stacji benzynowych i parkingów samochodowych w Lublinie z miejsc, w których gleba była nasycona olejami technicznymi i benzyną.

W badaniach aktywności powierzchniowej związków wytworzonych przez drobnoustroje oprócz szczepów wyizolowanych z gleby wykorzystano bakterie z rodzaju *Bacillus* pochodzące z Katedry Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa Akademii Rolniczej w Lublinie.

### *Izolacja drobnoustrojów*

Próbki gleb oznaczone symbolami P1, P2 oraz CPN1 i CPN2 po uprzednim zwilżeniu wodą inkubowano wstępnie w cieplarni w temperaturze 30°C. Następnie umieszczono je w łaźni wodnej i poddano ogrzewaniu przez 10 minut w temperaturze 70-80°C. Po tym czasie próbki wysiewano na płytki Petriego z podłożem stałym. Za-

stosowano agar odżywczy z dodatkiem 0.2 % skrobi rozpuszczalnej. Po dwóch dniach hodowli w temperaturze 37°C pojawiły się kolonie. Pojedyncze kolonie były jeszcze raz rozsiewane na podłoże agarowe już bez dodatku skrobi w celu otrzymania czystych kultur. Uzyskane czyste kolonie po dokładnym opisie makroskopowym, przeszczepiono na skosy agaru odżywczego poddano dalszym badaniom identyfikacyjnym.

### *Identyfikacja*

Identyfikację otrzymanych szczepów przeprowadzono według metod podanych przez Guiraud i Galzy [9], Burbiankę [4], Kocwową [11] i w oparciu o program komputerowy Bactax [14]. Oznaczono cechy makroskopowe i mikroskopowe kolonii bakteryjnych, oraz właściwości fizjologiczne i biochemiczne wyizolowanych szczepów, a w tym: stosunek do tlenu, metabolizm węglowodanowy (próby fermentacyjne, wytwarzanie acetoiny, hydroliza skrobi, wykorzystanie jonów cytrynianowych), metabolizm białkowy (hydroliza żelatyny i kazeiny, próba na wykrywanie indolu), metabolizm tłuszczowy (poszukiwanie lecytynazy), redukcja azotanów, badanie halofilności, wzrost przy pH 5.7. Wykonano pomiar pokrewieństwa między szczepami [12].

### *Hodowla szczepów na pożywkach płynnych*

Szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus* wyizolowane z gleby (siedem) jak i szczepy pochodzące z kolekcji zakładowej (pięć) hodowano na pożywce płynnej mineralnej [5]. Do inkubacji pobierano po 1 ml hodowli 18 godzinnych i przenoszono do kolbek stożkowych zawierających 100 ml sterylnej pożywki. Następnie prowadzono inkubację w temperaturze 37°C przez 4 dni na wytrząsarce przy 180 obr./min. Po badaniach wstępnych wybrano dwa najefektywniejsze szczepy i hodowano na pożywce z różnym stężeniem glukozy (1, 2, 4, 6 i 8 %) przez 4 doby w temperaturze 37°C. Po inkubacji oznaczano biomasę badanych szczepów i mierzono napięcie powierzchniowe płynów pochodzących. W tym celu uzyskany płyn odwirowywano na ultrawirówce przy 14 tys. do 14.5 tys. rpm, w czasie 20 min, zagęszczano na wyparce do uzyskania 10 ml zagęszczonego płynu i przeznaczano do pomiaru napięcia powierzchniowego.

### *Oznaczanie biomasy badanych szczepów*

Biomasę uzyskaną po odwirowaniu hodowli bakteryjnych oznaczano metodą suszarkową ( w temperaturze 105°C do uzyskania stałej masy).

### *Pomiar napięcia powierzchniowego*

Pomiar dokonywano metodą maksymalnego ciśnienia baniek przy pomocy zestawu Rebintera. Zlewkę z badanym płynem ustawiano tak, by kapilara aparatury badawczej dotykała powierzchni płynu. Następnie wprowadzano do układu pomiarowe-

go aparatury takie ciśnienie, które powodowało pojawianie się pęcherzyków gazu u wylotu kapilary. Miarą tego ciśnienia była różnica słupów cieczy powstająca w manometrze. Aby obliczyć wartość napięcia powierzchniowego płynów wyliczono stałą  $K$  dla kapilary ze wzoru:

$$K = \frac{\gamma_w}{h_w}$$

gdzie:  $h_w$  – różnica słupów cieczy w manometrze dla wody destylowanej w cm,  
 $\gamma_w$  – napięcie powierzchniowe wody w danej temperaturze.

Napięcie powierzchniowe wody  $\gamma_w$ , w mN/m odczytano z tablic uwzględniając temperaturę, w której odbywał się pomiar.

Wartość napięcia powierzchniowego badanych płynów  $\gamma_x$  obliczono korzystając ze wzoru:

$$\gamma_x = K \cdot \Delta h_x$$

gdzie:  $\Delta h_x$  – różnica słupów cieczy w manometrze dla badanych roztworów w cm.

Napięcie powierzchniowe wyrażono w mN/m (dyn/cm).

Tabela 1

Charakterystyka wyizolowanych szczepów z rodzaju *Bacillus*.

CPN1-8	P1-7	CPN2-6	CPN2-5	CPN2-3	P2-2	P1-1	Cechy fizjologiczne
+	+	+	+	+	+	+	Przetrwalniki owalne
-	-	-	-	-	-	-	Przetrwalniki okrągłe
+	+	-	-	-	-	-	Deformacja ściany komórki
+	-	+	-	+	+	+	Przetrwalniki centralne
+	+	-	+	-	-	-	Przetrwalniki terminalne
+	+	+	+	+	+	+	Wytwarzanie katalazy
-	+	+	+	+	+	+	Kwas z glukozy
-	-	-	-	-	-	-	Gaz z glukozy
-	+	+	-	+	+	+	Kwas z arabinozy
-	-	-	-	-	-	-	Gaz z arabinozy
-	+	+	-	-	-	+	Kwas z ksylozy
-	-	-	-	-	-	-	Gaz z ksylozy
-	+	-	-	+	+	+	Kwas z manitolu
-	-	-	-	-	-	-	Gaz z manitolu
-	-	-	-	-	-	-	Wytwarzanie acetoiny
-	+	+	+	+	-	+	Hydroлиза skrobi
+	+	+	+	+	+	+	Hydroлиза żelatyny
-	-	+	+	+	+	+	Hydroлиза kazeiny
-	-	-	-	-	-	-	Wytwarzanie indolu
-	-	-	+	-	-	-	Wytwarzanie lecytynazy
-	+	-	+	-	+	+	Redukcja azotanów
-	-	+	-	-	-	+	Alkaliczacja cytrynianów
-	-	+	+	+	+	+	Wzrost przy 5 % NaOH
-	-	+	+	+	+	+	Wzrost przy 7 % NaOH
+	+	+	+	+	+	+	Wzrost przy pH 5.7
<i>B. brevis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	Prawdopodobna przynależność gatunkowa

## Wyniki i dyskusja

W wyniku izolacji bakterii przetrwalnikujących z różnych próbek gleb otrzymano 7 szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* (oznakowane jako: P1-1, P2-2, CPN2-3, CPN2-5, CPN2-6, P1-7 i CPN1-8) i poddano identyfikacji. Wyniki porównano z gatunkami o najbardziej zbliżonych cechach i podano w tabeli 1. Aktywność powierzchniową płynów pochodzących z hodowli drobnoustrojów z rodzaju *Bacillus* podano na wykresach 1, 3 i 5.

Wykres 1 przedstawia aktywności powierzchniowe płynów hodowlanych oraz produkcję biomasy przez szczepy wyizolowane i pochodzące z kolekcji własnej hodowane przez 96 godzin na pożywce płynnej z 1 % glukozy.

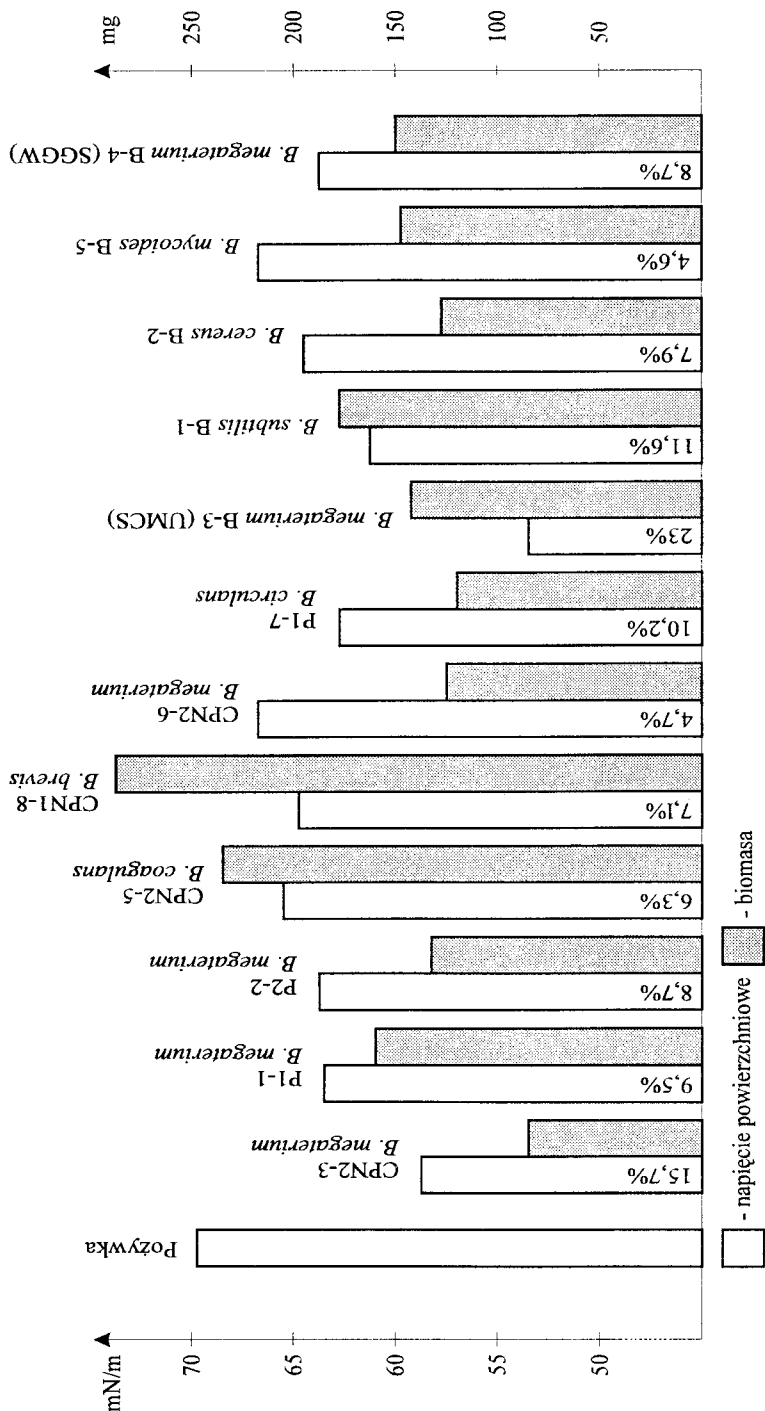
Wśród wyizolowanych szczepów najaktywniejszym okazał się szczep *B. megaterium* CPN2-3. Napięcie powierzchniowe jego płynu hodowlanego było niższe w porównaniu z pożywką wyjściową o 15.7 % i zmniejszyło się z 69.85 do 58.85 mN/m. Wykazał się przy tym najniższą produkcją biomasy wynoszącą 58.5 mg.

Średnią aktywność w wytwarzaniu substancji powierzchniowo czynnych wykazały dwa szczepy: *B. circulans* P1-7 – zmniejszył napięcie powierzchniowe o 10.2 % do 62.7 mN/m i *B. megaterium* P1-1 – o 9.5 % do 63.25 mN/m. Pozostałe szczepy *B. megaterium* P2-2, *B. coagulans* CPN2-5 *B. brevis* CPN1-8 i *B. megaterium* CPN2-6 odznaczały się mniejszym uzdolnieniem. Napięcie płynów pochodzących wynosiło odpowiednio: 63.8; 65.45; 64.9; 66.55 mN/m.

Szczepy pochodzące z kolekcji własnej charakteryzowały się dużą zmiennością w aktywności powierzchniowej. Najwięcej związków powierzchniowo czynnych wytworzył szczep *B. megaterium* B-3 (UMCS). Zmniejsza on napięcie powierzchniowe pożywki o 23.0 % z 69.85 do 53.75 mN/m. Średnio aktywny był szczep *B. subtilis* B-1, który obniżył napięcie powierzchniowe odżywki o 11.6 % do 61.6 mN/m. Płyny hodowlane pozostałych szczepów: *B. cereus* B-2, *B. mycoides* B-5, *B. megaterium* B-4 (SGGW) charakteryzowały się małym spadkiem napięcia powierzchniowego (odp.: 64.35; 66.7 i 63.8 mN/m).

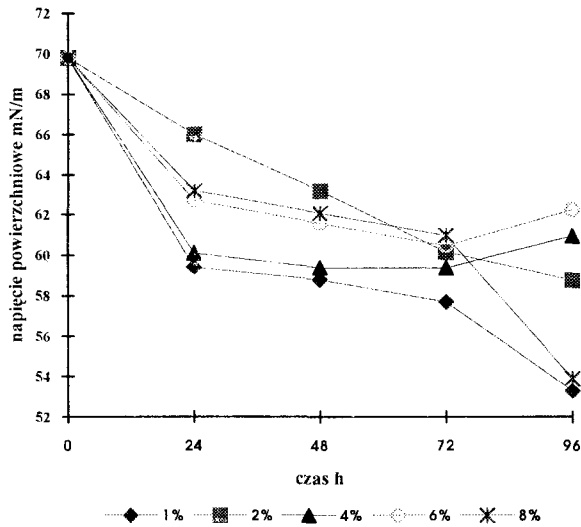
W drugim etapie badań najefektywniejszy szczep pochodzący z kolekcji katedry – *B. megaterium* B-3 (UMCS) wykazał największą aktywność gdy był hodowany na pożywce z 1 % glukozy, gdyż zmniejszał on napięcie powierzchniowe płynu hodowlanego po 96 godzinach hodowli o 23.6 % z 69.85 do 53.35 mN/m (wykres 2), uzyskał przy tym nieco większe obniżenie napięcia powierzchniowego jak we wstępnych badaniach (23.0 %).

Natomiast najefektywniejszy szczep wyizolowany – *B. megaterium* CPN2-3 największą aktywność wykazał na pożywce z 6 % glukozy po 48 godzinach hodowli obniżając napięcie powierzchniowe pożywki o 18.9 % do 56.65 mN/m (wykres 4). Zbliżonymi wartościami charakteryzowały się płyny otrzymane z hodowli szczepu na pożywce z 1 % glukoza po 72 godzinach (57.2 mN/m). Najmniej związków po-

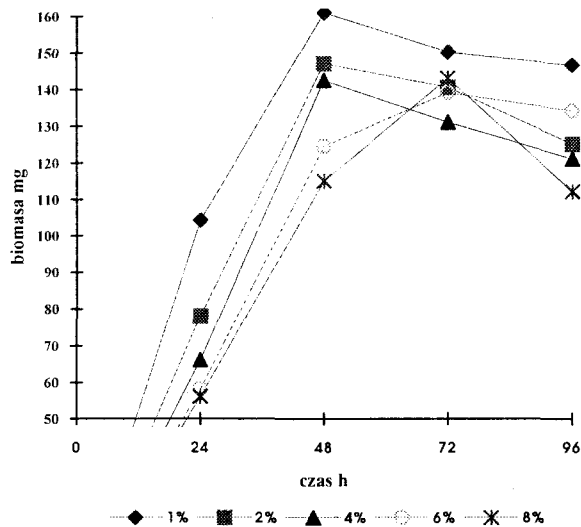


Wykres 1. Napięcie powierzchniowe płynów pochodzących i biomasa szczepów wyizolowanych i zakładowych z rodzaju *Bacillus* hodowanych na pożywce z 1 % glukozy.

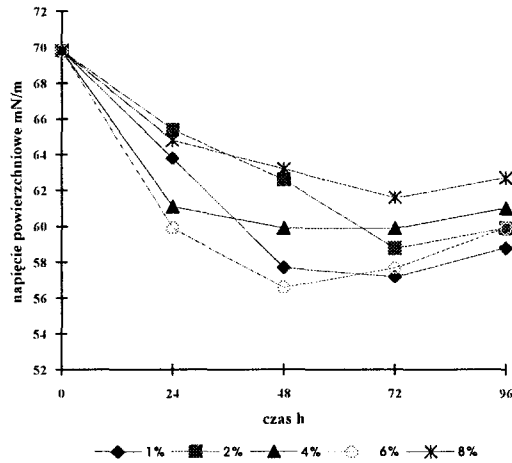
wierzchniowo czynnych szczep ten wytworzył, gdy był hodowany na pożywce z 8 % glukozą.



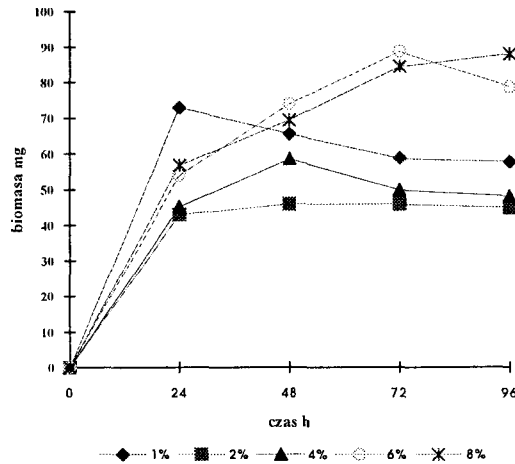
Wykres 2. Napięcie powierzchniowe płynów pochodzących szczepu *B. megaterium* B-3 (UMCS) hodowanego na pożywce płynnej przy stężeniu glukozy: 1, 2, 4, 6, 8 %.



Wykres 3. Produkcja biomasy przez szczep *B. megaterium* B-3 (UMCS) hodowany na pożywce płynnej przy stężeniu glukozy: 1, 2, 4, 6, 8 %.



Wykres 4. Napięcie powierzchniowe płynów pochodzących szczepu *B. megaterium* CPN2-3 hodowanego na pożywce płynnej przy stężeniu glukozy: 1, 2, 4, 6, 8 %.



Wykres 5. Produkcja biomasy przez szczep *B. megaterium* CPN2-3 hodowany na pożywce płynnej przy stężeniu glukozy: 1, 2, 4, 6, 8 %.

Podobną izolację prowadzili Jenneman i wsp. [10]. Wyizolowali oni około trzydziestu szczepów, które poddane były badaniom nad zdolnością do produkcji pozakórkowych surfaktantów. Najaktywniejszym okazał się szczep, który obniżał napięcie powierzchniowe pożywki o 63.5 % z 74 do 27 mN/m. Po przeprowadzeniu taksonomii fizjologicznej szczep ten okazał się drobnoustrojem z rodzaju *Bacillus*, gatunek *B.*



*licheniformis*. Surfaktant produkowany był na podłożu z sacharozą i solami mineralnymi podczas logarytmicznego wzrostu szczepu.

Z kolei Cooper i Goldenberg [5] badali aktywność powierzchniową szczepów *Bacillus sp.* IAF 343 i *Bacillus cereus* IAF 346 wyizolowanych z próbek olejowych. Szczepy hodowane były na pożywce mineralnej z 1 % sacharozy. *B. cereus* spowodował obniżenie napięcia powierzchniowego o 24.3 % z 37 do 28 mN/m po 96 godzinach hodowli. Na tym samym podłożu tylko, że z 1% glukozy były hodowane w tej pracy szczepy wyizolowane i pochodzące z kolekcji katedry. Najaktywniejszy ze szczepów – *B. megaterium* B-3 (UMCS) uzyskał podobną wartość (23.6 %) jak w pracy Coopera. Natomiast pozostałe szczepy okazały się mniej aktywne niż *B. cereus* IAF 346.

Wśród producentów związków powierzchniowo czynnych wymieniane są bakterie jak i drożdże. Duvnjak [6] hodując *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 na podłożach zawierających glukozę lub węglowodany uzyskał 48.3 % spadek napięcia powierzchniowego płynów pohodowlanych (z 62 do 32 mN/m). Szczep ten okazał się również aktywniejszy od szczepów przebadanych w tej pracy. Płyny pohodowlane *Corynebacterium lepus* zawierały surfaktanty, które obniżały napięcie powierzchniowe płynu o 53.8 % z 65 do 30 mN/m [7]. W hodowlach zawierających węglowodory jako jedyne źródło węgla związki powierzchniowo czynne są wydzielane do podłoża, jeżeli natomiast jedynym źródłem węgla jest glukoza to surfaktanty związane są z komórką a uwolnienie ich odbywa się dopiero po dodaniu heksadekanu.

Banat i wsp. [1] badali właściwości szczepu Pet 1006 produkującego biosurfaktanty na podłożu z glukozą i dodatkiem substratu węglowodorowego. Wykazali, że szczep ten charakteryzuje się wysoką aktywnością obniżając wyjściowe napięcie powierzchniowe z 76 do 33.2 mN/m (56.3 %) po 30 godzinach. Wynik ten jest wyższy od najlepszego wyniku uzyskanego w tej pracy (23.6 %).

Podobne wyniki uzyskał Mac Donald i wsp. [13] hodując szczep *Nocardia erythropolis* na podłożu złożonym z soli mineralnych i węglowodorów. Najwyższy spadek napięcia powierzchniowego (z 62 do 33.3 mN/m) uzyskał między trzydziestą a czterdziestą godziną hodowli i wynosił on 46.2 %.

Płyny pohodowlane wszystkich przebadanych szczepów zarówno pochodzących z kolekcji Katedry jak i wyizolowanych wykazały się mniejszym spadkiem napięcia powierzchniowego w porównaniu z danymi cytowanych powyżej prac. Ostateczne porównanie aktywności powierzchniowej mogłoby być przeprowadzone po wyizolowaniu i oczyszczeniu produkowanych przez szczepy biosurfaktantów.

## Wnioski

1. W wyniku przeprowadzonej taksonomii fizjologicznej określono przynależność gatunkową: P1-1, P2-2, CPN2-3, CPN2-6 - *Bacillus megaterium*, CPN2-5 - *Bacillus coagulans*, P1-7 - *Bacillus circulans*, CPN1-8 - *Bacillus brevis*.

2. Najaktywniejszym ze szczepów wyizolowanych okazał się *Bacillus megaterium* CPN2-3 obniżając napięcie powierzchniowe podłoża hodowlanego o 18.9 % z 69.85 do 56.65 mN/m.
3. Najaktywniejszym szczepem pochodzącym z kolekcji Katedry okazał się *Bacillus megaterium* B-3 (UMCS) obniżając napięcie powierzchniowe o 23.6 % z 69.85 do 53.35 mN/m.

## LITERATURA

- [1] Banat J.H., Somach N., Murad M., Home R., Banerjee S.: Biosurfactant production and use in oil tank clean - up, *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 1991, 7, 80-81.
- [2] Bhupathiraju V.K., Mc Inerney M.J.: Pretest studies for a Microbially Enhanced Oil Recovery, *Developments in Industrial Microbiology*, 1993, 11, 19-34.
- [3] Brown M. J.: Biosurfactant for cosmetic applications, *Int. J. Cosmetic Sci.*, 1991, 13, 61-64.
- [4] Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: *Mikrobiologia żywności*, PZWL, Warszawa 1983.
- [5] Cooper D.G., Goldenberg B.G.: Surface - active agents from two *Bacillus species*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53, 224-229.
- [6] Duvnjak Z., Cooper D.G., Kosaric N.: Production of surfactant by *Arthobacter paraffineus* ATCC 19558, *Biotechnol. Bioeng.*, 1982, 24, 165-175.
- [7] Duvnjak Z., Kosaric N.: Production and release of surfactant by *Corynebacterium lepus* in hydrocarbon and media. *Biotechnol. Lett.*, 1985, 7, 793-796.
- [8] Fiechter A.: Biosurfactant: moving towards industrial application. *TIBTECH*, 1992, 10, 208-217.
- [9] Guiraud J., Galazy P.: *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*, Les editions de L'Usine Nouvelle. Paris 1981.
- [10] Jenneman G.E., Mc Inerney M.J., Knapp R.M.: A halotolerant, biosurfactant - producing *Bacillus species* potentially useful for Enhanced Oil Recovery, *Del. Ind. Microbiol.*, 1983, 24, 485-492.
- [11] Kocwowa E.: *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej*, PWN 1981.
- [12] Leclerc H., Mossel D.A.A.: *Microbiologie*. Doin Editeurs, Paris 1989.
- [13] Mac Donald C.R., Cooper D.G., Zajic J.E.: Surface - active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1981, 41, 117-123.
- [14] Walczak P.: Program komputerowy „BACTAX”. Instytut Technologii Farmacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej.

## SEARCHING FOR DIFFERENT *BACILLUS* STRAINS PRODUCING SURFACE ACTIVE SUBSTANCES

### S u m m a r y

Surface tension activity of bacterial strains from the species *Bacillus* isolated from soil saturated with engine and technical oils were investigated. Bacterial identification and measurements of the surface tension in the culture filtrates of the bacterial strains were carried out. For comparison, a *Bacillus* strain from the Culture Collection at the Dep. of Food Technology and Storage was used to compare the surface tension activities of the used *Bacillus* strains. The best strain decreased the surface tension of the medium by 23.6 %, i.e from 69.85 to 53.35 mN/m. ☒