

## I. Streszczenie

Obecnie pojawia się coraz więcej doniesień o obecności farmaceutyków, w tym niesteroidowych leków przeciwzapalnych, w środowisku naturalnym. Jednym z nich jest naproksen, który nie ulega całkowitej biodegradacji w organizmie człowieka. Dodatkowo, oczyszczalnie ścieków nie są przystosowane do jego utylizacji. W ostatnich latach wyizolowano i opisano szczepy bakteryjne, charakteryzujące się zwiększonymi możliwościami degradacyjnymi naproksenu. Celem pracy doktorskiej była immobilizacja szczepów bakteryjnych zdolnych do degradacji naproksenu. Dokonano charakterystyki zastosowanego nośnika oraz utworzonych na jego powierzchni biofilmów bakteryjnych. Ustalono wpływ unieruchamiania na przebieg rozkładu leku w warunkach monokulturowych, a także w obecności autochtonicznej mikroflory złoża biologicznego. Ponadto zbadano zmiany aktywności enzymów zaangażowanych w rozkład naproksenu w wyniku immobilizacji.

Badania nad wpływem immobilizacji na biodegradację naproksenu rozpoczęto przeprowadzeniem optymalizacji procesu unieruchamiania. Jednakże, aby poprawnie ocenić stan fizjologiczny immobilizowanych bakterii w biofilmie, zmodyfikowano metodę bazującą na hydrolizie dioctanu fluoresceiny. Wprowadzona modyfikacja polegała na ominięciu odrywania biofilmu od nośnika i przeprowadzenie testu na nienaruszonym biofilmie wraz z nośnikiem. Opracowana procedura zakłada wytrząsanie próbek w buforze fosforanowym o pH w zakresie 7,4-7,6 przez 1 godzinę, a wynik wyrażano jako całkowitą aktywność metaboliczną (TEA). Analiza czułości testu, w trakcie której mierzono zmiany TEA w wyniku głodzenia pozwoliła wyznaczyć minimalny endogenny metabolizm szczepu *Bacillus thuringiensis* B1(2015b), wynoszący 161-170  $\mu\text{g/g}$  suchej masy na godz. Zaobserwowano również, że niedobór substancji odżywczych indukuje na powierzchni pianki poliuretanowej proces tworzenia biofilmu przez komórki szczepu B1(2015b).

W wyniku optymalizacji unieruchamiania szczepu *Planococcus* sp. S5 na gąbce Loofah zaobserwowano, że najwyższe wartości TEA ( $1250,26 \pm 87,61 \mu\text{g/g}$  suchej masy na godz.) osiągnęto podczas 72-godzinnej inkubacji w minimalnej pożywce mineralnej (MSM) o pH 7,2 dodatkowo suplementowanej glukozą, NaCl oraz  $\text{MnSO}_4$ , wytrząsanej przy 90 rpm w  $30^\circ\text{C}$  oraz przy wysokiej koncentracji komórek. Szczep *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) immobilizowany na gąbce Loofah wykazywał największe wartości TEA ( $790,14 \pm 40,60 \mu\text{g/g}$  suchej masy na godz.) po 48-godzinnej inkubacji w podłożu HTC o pH 8, suplementowanej glukozą oraz  $\text{MnSO}_4$ , wytrząsanej przy 110 rpm w  $20^\circ\text{C}$  przy niskiej koncentracji komórek.

Analiza rozkładu naproksenu przez szczep *Planococcus* sp. S5 wykazała działanie hamujące leku w stężeniu wyższym niż 12 mg/L na wolne komórki tego szczepu. Zaobserwowano, że wolne komórki S5 były zdolne do całkowitego rozkładu leku w stężeniu 6, 9 oraz 12 mg/L w odpowiednio 38, 44 oraz 62 dni. Rozkład leku przebiegał dwufazowo. Pierwsza faza, trwająca 29 dni charakteryzowała się

wolniejszym rozkładem naproksenu. Podczas drugiej fazy obserwowano dwukrotnie szybszy rozkład leku. Immobilizowane na gąbce Loofah komórki S5 były zdolne do całkowitej degradacji leku we wszystkich analizowanych stężeniach, a tempo rozkładu było stałe, niezależne od dnia inkubacji oraz zbliżone do szybkości degradacji w trakcie II fazy przeprowadzanej przez komórki wolne. Badania nad przebiegiem wielokrotnych cykli degradacji naproksenu w najniższym analizowanym stężeniu wykazały, że w wyniku immobilizacji, komórki *Planococcus* sp. S5 zachowały pełną zdolność degradacyjną przez 55 dni, rozkładając w tym czasie 3 dawki leku. W trakcie rozkładu leku, komórki S5 wydzielają znaczne ilości egzopolisacharydów w celu zwiększenia bariery ochronnej przed naproksenem. Badania nad wpływem immobilizacji szczepu *Planococcus* sp. S5 na aktywność enzymów zaangażowanych w rozkład naproksenu wykazały, że immobilizacja nie spowodowała zmiany szlaku jego degradacji. Zaobserwowano natomiast znaczące zmiany w wartościach tych aktywności. Wykazano, że aktywność enzymatyczna w I fazie rozkładu leku przez wolne komórki S5 była znacznie niższa niż w fazie szybszego rozkładu. Pomimo zbliżonego tempa degradacji leku przez wolne komórki S5 w II fazie oraz przez immobilizowane komórki S5, aktywność analizowanych enzymów komórek immobilizowanych była znacznie wyższa niż wolnych komórek.

Przebieg biodegradacji naproksenu przez immobilizowane na gąbce Loofah komórki szczepu *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) monitorowano w złożu biologicznym augmentowanym autochtoniczną mikroflorą pochodzącą z komory przepływowej osadnika Imhoff'a w Krupskim Młynie – Ziętek. Analiza wykazała, że immobilizowane komórki B1(2015b) zdegradowały 70% naproksenu w stężeniu 1 mg/L w nieaugmentowanym złożu biologicznym. Natomiast w obecności autochtonicznej mikroflory, unieruchomione komórki B1(2015b) w tym samym czasie rozłożyły 90% leku. Uzyskane wyniki ukazały synergistyczne oddziaływanie pomiędzy autochtoniczną mikroflorą złoża biologicznego a wprowadzonymi komórkami B1(2015b), które skutkowało przyspieszeniem biodegradacji naproksenu. Dzięki analizie bakteryjnych regionów V3-V5 genu 16S rRNA z zastosowaniem elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE), potwierdzono, że wprowadzony szczep *Bacillus thuringiensis* B1(2015b) był zdolny do przetrwania oraz namnażania się w złożu biologicznym po zakończonym procesie degradacji naproksenu. Ponadto przeprowadzono analizę zmian jakościowych populacji bakteryjnych oraz grzybowych autochtonicznej mikroflory złoża biologicznego po ekspozycji na naproksen, a także po wprowadzeniu immobilizowanych komórek B1(2015b). Wykazano, że naproksen spowodował wyraźne obniżenie bioróżnorodności mikroflory bakteryjnej. Szczepy grzybowe charakteryzowały się mniejszą wrażliwością na lek. Natomiast w wyniku wprowadzenia immobilizowanych komórek B1(2015b), które były zdolne do szybkiej eliminacji leku, obserwowano wzrost bioróżnorodności mikroflory bakteryjnej oraz grzybowej.