

Słowa kluczowe: bakterie luminescencyjne, hodowla tkankowa, ramnolipid, biokompleks

Barbara KOŁWZAN*, Joanna BIAZIK*, Anna CZARNY**,
Ewa ZACZYŃSKA**, Elena KARPENKO***,

OCENA TOKSYCZNOŚCI BIOSURFAKTANTÓW PRODUKOWANYCH PRZEZ *Pseudomonas sp.* PS-17

Celem pracy była ocena toksyczności i cytotoxyczności biosurfaktantów produkowanych przez bakterie należące do rodzaju *Pseudomonas* PS-17. Do badań wykorzystano system Microtox pracujący w oparciu o bakterie luminescencyjne oraz hodowle tkankowe, fibroblastów ludzkich i mysich. Wykazano, że ramnolipid RL i biokompleks BX posiadają zbliżone zdolności obniżania napięcia powierzchniowego jednak nieco różnią się właściwościami biologicznymi. Wprawdzie oba badane związki charakteryzowały się niską toksycznością to jednak biosurfaktant o charakterze ramnolipidu był zdecydowanie bardziej toksyczny i cytotoxyczny.

1. WSTĘP

Związki powierzchniowo czynne są szeroko wykorzystywane w wielu sektorach przemysłu [5,9]. Większość znajdujących się na rynku preparatów syntetyzowana jest na drodze chemicznej. Obok niewątpliwych właściwości użytkowych wykazują one cechy niekorzystne związane z wysoką toksycznością oraz niską podatnością na biodegradację. Dlatego też coraz szersze zainteresowanie budzą związki powierzchniowo-czynne produkowane przez mikroorganizmy, rośliny i zwierzęta. Zaletą surfaktantów produkowanych przez mikroorganizmy jest możliwość nie tylko skutecznego obniżenia napięcia powierzchniowego, ale także ich wysoka podatność na biodegradację [4]. Biosurfaktanty są zwykle związkami nietoksycznymi i nie kumulują się w tkankach organizmów żywych. Ponadto charakteryzuje je wysoka specyficzność działania, a także stabilność temperaturowa i stosunkowo mała wrażliwość na zmiany odczynu środowiska. Wprawdzie stosowanie biosurfaktantów może wiązać się ze wzrostem kosztów opracowanej technologii to jednak ich użytkowanie globalnie okazuje się bardziej ekonomiczne z uwagi na fakt, że w przeciwieństwie do surfaktantów syntetycznych nie stanowią one zagrożenia dla organizmów żywych [1].

* Politechnika Wroclawska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Zakład Biologii i Ekologii, 50-370 Wrocław, ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, email: justyna.rybak@pwr.wroc.pl

** Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53- 114 Wrocław

*** National University „Lviv Plytechnic”, Lviv, Ukraine

Biosurfaktanty znajdują zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu a także w rolnictwie. Stymulują biodegradację węglowodorów w technologiach oczyszczania wód i gruntów skażonych produktami naftowymi a także wykorzystywane są do wspomagania procesu wydobywania ropy naftowej [3]. Ich zdolność do kompleksowania metali pozwala na zastosowanie w procesach ługowania metali. Biosurfaktanty wykorzystywane są także w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym z uwagi na właściwości antybakteryjne i antywirusowe oraz znakomite właściwości zwilżające [7,11,12]. W przemyśle spożywczym używane są do emulsyfikacji, rafinacji olei i tłuszczów. Ułatwiają procesy nawożenia gleb i ochronę roślin poprzez rozpuszczanie, rozdrabnianie nawozów oraz środków ochrony roślin. Wspomagają także odżywanie roślin [10]. Możliwość tak szerokiego stosowania biosurfaktantów stwarza konieczność dokładnej analizy nie tylko ich właściwości użytkowych, ale także oceny oddziaływania na organizmy żywe.

Celem przedstawionej pracy była ocena toksyczności i cytotoxyczności biosurfaktantów wytwarzanych przez *Pseudomonas* PS-17.

2. MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły substancje powierzchniowo czynne wydzielane pozakomórkowo przez *Pseudomonas sp.* PS-17: ramnolipidy RL oraz biokompleks zawierający ramnolipidy oraz egzopolisacharyd.

Izolacji biosurfaktantów dokonywano po hodowli mikroorganizmów na podłożu mineralnym zawierającym glicerol (30 g/l) w charakterze źródła węgla. Odczyn hodowli wynosił pH=7,0. Hodowlę prowadzono w 30°C, przez 96 h. Napięcie powierzchniowe i międzyfazowe oznaczono metodą platynowej płytki Wilhelmięgo, natomiast zawartość ramnolipidów metodą antronową. Powierzchniowo-czynny biokompleks otrzymywano poprzez zakwaszenie supernatantu do pH=3,0, natomiast ramnolipidy ekstrahując biokompleks mieszaniną chloroform:metanol 2:1.

Do oznaczenia toksyczności wykorzystano test z bakteriami luminescencyjnymi *Vibrio fischeri*. Test wykonano wg standardowej procedury producenta przy użyciu analizatora M 500 i liofilizowanych bakterii. Obliczenia wyników dokonano przy zastosowaniu programu MicrotoxOmni. Wyniki toksyczności obliczano jako EC50, czyli takie stężenie badanej próbki, które powoduje powstanie 50% reakcji testowej – przeżyciowej (E).

Badania w kierunku cytotoxycznego działania badanych biosurfaktantów prowadzono na jednowarstwowej hodowli ludzkich nabłonkopodobnych komórek raka płuc – A549 (American Type Culture Collection, Cell Culture Line-ATCC CCL185) oraz na hodowli mysich komórek fibroblastycznych –L929 (American Type Culture Collection, Cell Culture Line-ATCC CCL 1). Hodowle komórek A549 prowadzono w płynie hodowlanym Dulbecco natomiast komórek L929 w płynie

Eagle'a, z dodatkiem 10% surowicy cielęcej, 2mM L-glutaminy oraz 100 j/ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny [1]. Badanie cytotoksycznego działania roztworów wodnych biosurfaktantów wykonano metodą bezpośredniego kontaktu w warunkach *in vitro*. Stopień cytotoksyczności poszczególnych prób określano w odwróconym mikroskopie. Minimalne stężenie badanych prób, które powodowało degenerację 50% komórek uznano za dawkę toksyczną (TCCD₅₀- Tissue Culture Cytotoxic Dose) [2,8].

4. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Biosurfaktanty RL produkowane przez *Pseudomonas* PS-17 były ramnolipidami, których cząsteczka zawierała ramnozę i kwas 3-oxidekanowy. Niski poziom napięcia powierzchniowego i międzyfazowego oraz ich krytyczne stężenie micelizacji wskazują na ich wysoką aktywność powierzchniową (tab. 1). Zewnątrzkomórkowy biokompleks syntetyzowany przez *Pseudomonas* PS-17 składał się z ramnolipidu oraz polisacharydu o charakterze alginianu z masą cząsteczkową w zakresie 3–4 x10⁵.

Tab. 1. Wybrane właściwości badanych preparatów

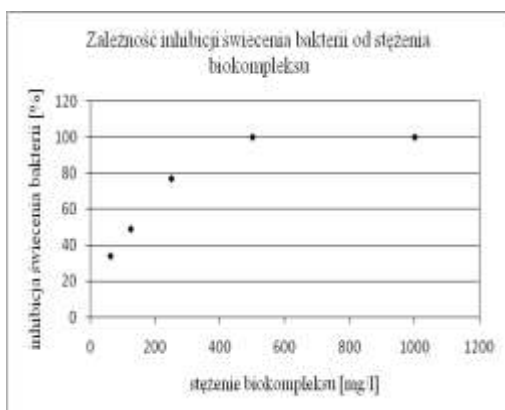
Substancja	Napięcie powierzchniowe (mN/m)	Napięcie międzyfazowe (n-heptan),(mN/m)	Indeks emulgacji E ₂₄ , %
Ramnolipid RL	28,8	0,02	70
Biokomplex BX	29,5	0,17	85

Stwierdzono wyraźny wpływ roztworów badanych surfaktantów na zdolność do świecenia bakterii testowych. Stężenie biokompleksu hamujące o 50% luminescencję bakterii testowych było około 10 razy wyższe niż ramnolipidu (tab. 2). Oznacza to, że preparat BX jest mniej toksyczny dla bakterii testowych.

Tab. 2. Stężenia preparatów hamujące o 50% luminescencję bakterii testowych

Substancja	EC ₅₀ [mg/l]
Ramnolipid RL	13
Biokompleks BX	110

Badane biosurfaktanty różniły się wyraźnie właściwościami biologicznymi. W przypadku ramnolipidu całkowite zahamowanie świecenia powodowało stężenie wynoszące 100 mg/litr natomiast w przypadku biokompleksu było ono 10 krotnie wyższe i wynosiło 1 gram/litr (rys. 1–2). Ramnolipidy wykazały zarówno wyższą toksyczność jak i cytotoksyczność.



Rys. 1. Zależność luminescencji od stężenia biokompleksu



Rys. 2. Zależność luminescencji od stężenia ramnolipidu

Analogiczne rezultaty uzyskano badając cytotoksyczność obu preparatów (tab. 3, rys. 3). Biokompleks po 24, 48 godzinach kontaktu z komórkami okazał się toksyczny w stężeniu 50 µg/ml, a po 72 godz. w stężeniu 25 µg/ml obserwowano degenerację jeszcze żywych komórek. Ramnolipid RL był cytotoksyczny po 24,48 godzinach kontaktu z komórkami w stężeniu 50 µg/ml i 25 µg/ml a w obecności stężenia 12,5 µg/ml żywe komórki zostały zdegenerowane. Po 72 godzinach kontaktu cytotoksyczne okazały się stężenia 50, 25 i 12,5 µg/ml a stężenie 6,25 µg/ml powodowało degenerację komórek (±komórki jeszcze żywe).

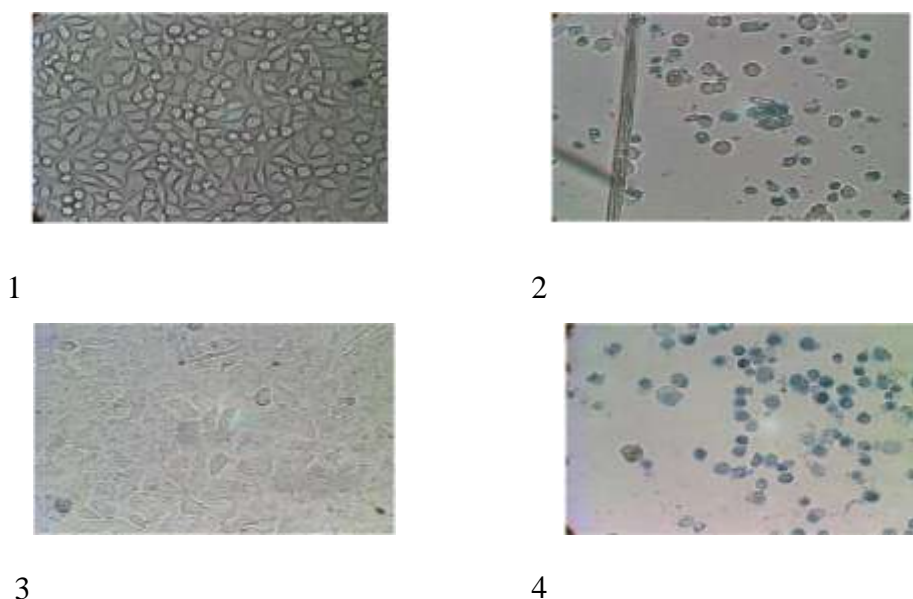
Tab. 3. Cytotoksyczność badanych preparatów

Stężenie biosurfaktantu (mg/l)	Czas kontaktu z komórkami L929 i A549 (h)					
	24		48		72	
	RL	BX	RL	BX	RL	BX
50	+	+	+	+	+	+
25	+	-	+	-	+	+
12,5	-	-	±	-	+	-
6,25	-	-	-	-	±	-

+ próba cytotoksyczna, - brak cytotoksyczności, prawidłowy wzrost komórek, ±próba cytotoksyczna, degeneracja komórek

Niską cytotoksyczność biosurfaktantów potwierdzają uprzednio przeprowadzone badania, w których wykazano, że częściowo oczyszczony zewnątrzkomórkowy polisacharyd typu alginowego produkowany przez szczep *Pseudomonas aeruginosa* 219 nawet w stężeniu powyżej 1000 µg/ml nie był toksyczny dla komórek ludzkich A549 jak i mysich L929. Również w badaniach *in vivo* na modelu mysim nie stwierdzono efektów toksycznych [2].

Należy przypuszczać, że badane preparaty poddane dalszemu oczyszczaniu mogą stracić właściwości toksyczne zachowując inne cechy umożliwiające ich praktyczne wykorzystanie.



Rys. 3. Obraz mikroskopowy komórek ludzkich i mysich

linii L929: 1 – komórki prawidłowe 2 - komórki zdegenerowane w wyniku toksycznego wpływu preparatu, linii - A549: 3 – komórki prawidłowe. 4 – komórki zdegenerowane

5. PODSUMOWANIE

Ramnolipid RL i biokompleks BX są związkami powierzchniowo czynnymi pochodzenia naturalnego. Przeprowadzone badania wskazują na niską toksyczność i cytotoxyczność badanych preparatów. Stwarza to możliwość ich praktycznego wykorzystania. Z ekonomicznego punktu widzenia wydaje się, że szczególnie biokompleks powinien znaleźć zastosowanie w technologiach oczyszczania środowiska skażonego produktami naftowymi lub innymi zanieczyszczeniami o charakterze hydrofobowym. Produkcja tego preparatu nie będzie kosztowna, gdyż nie wymaga specjalnych metod separacji i oczyszczania. Biosurfaktant o charakterze ramnolipidu RL jest preparatem interesującym dla innych gałęzi przemysłu, rolnictwa czy farmacji jednakże jego bezpośrednie użycie wymagać będzie dodatkowych zabiegów związanych z dokładnym oczyszczeniem. Przewagą biosurfaktantów nad syntetycznymi surfaktantami jest ich wyższa biodegradowalność, niższa toksyczność,

a także niewielkie ilości, w których są one stosowane [4]. W związku z tym ich zaleganie w środowisku nie stwarza zagrożenia ekologicznego. Dzięki swym licznym zaletom biosurfaktanty mogą w przyszłości całkowicie zastąpić ich chemiczne odpowiedniki.

LITERATURA

- [1] Czarny A., Kołwzan B., Zaczynska E. Cytotoxicity and antibacterial activity of synthesis surfactants. Chemicals in Sustainable Agriculture. Ed. Czech-Pol Trade, Prague-Brussels-Stockholm. 2003;563-567.
- [2] Czarny A., Boratyński J., Kołwzan B.; Isolation and characterization of extracellular polymers produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Chemistry for Agriculture – vol 5 pp. 410 – 415. "New Agrochemicals and Their Safe Use For Health and Environment". Edited by H. Górecki, Z. Dobrzański, P.Kafarski, 2004. Czech –Pol Trade, Prague, Brussels.
- [3] Banat I.M., R.S. Makkar, S.S. Cameotra. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 2000, 53 (5), P.495-508
- [4] Edwards K.R., J.E. Lepo, M.A. Lewis. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. Marine Pollution Bulletin, Vol.46 (10), 2003, P. 1309-1316
- [5] Елисеев А.С., Кучер Р.В. Поверхностно-активные вещества и биотехнология. – К.: Наукова думка, 1991. – 116 с. 110.
- [6] Gogolewski S, Górna K, Zaczynska E, Czarny A. Structure-property relations and cytotoxicity of isosorbide-based biodegradable polyurethane scaffolds for tissue repair and regeneration. Journal of Biomedical Materials Research. 2008, Vol.85 (A), pp 456-465.
- [7] Lang S., E. Katsiwela, F. Wagner, Antimicrobial effects of biosurfactants. Fat Sci. Technol. 91 Jahrgang, #9, 1989, p. 363-366
- [8] Mendyka B., Radek P., Wargacka A., Czarny A., Zaczynska E., Pawlik M. Cytotoksyczność i mutagenność preparatów zawierających domieszkę estru metylowego oleju rzepakowego. 2008. Medycyna Środowiskowa; 8 (2),139-145
- [9] Muthusamy K., S. Gopalakrishnan, T.K. Ravi, P. Sivachidambaram. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. Current Science, 2008, Vol. 94, No. 6, P. 736-747
- [10] Mukherjee S., Das P., and Sen R., Towards commercial production of microbial surfactants. Trends in Biotechnology 24 (2007) 11 99-121
- [11] Patent of USA. Immunological activity of rhamnolipids. G.Piljac, V.Piljac. Patent No.: 5466675, Nov. 14, 1995.
- [12] Remichkova M., D. Galabova, I. Roeva, E. Karpenko, A. Shulga, A. Galabov. Anti-Herpesvirus Activities of *Pseudomonas sp. S-17* Rhamnolipid and its Complex with Alginate. Z. Naturforsch,2008, 63, 75-81.

ASSESSMENT OF TOXICITY OF BIOSURFACTANTS PRODUCED BY PSEUDOMONAS SP PS-17

Aim of this work was assessment of toxicity and cytotoxicity of biosurfactants produced by *Pseudomonas sp* PS-17. System Microtox which work with luminescent bacteria and tissue culture of human and mouse fibroblasts was used in research. Both preparations have similar abilities to reduce surface tension but different biological properties. Although both compounds was characterized by low toxicity however biosurfaktant with rhamnolipids character was more toxic and cytotoxic than polysaccharide biopolymer.