

## Streszczenie

W niniejszej rozprawie doktorskiej zbadane zostały mechanizmy oraz zdolności sorpcyjne układów biokoloidalnych takich jak komórki żywych mikroorganizmów i biologicznie syntezowane nanocząstki srebra. Prace nad opisem procesów sorpcyjnych zachodzących na powierzchni biokoloidów prowadzone były na trzech płaszczyznach. Pierwszą z nich stanowiło opracowanie metody przygotowania próbek mikrobiologicznej poprzez zastosowanie modyfikacji powierzchni dzikich szczepów drobnoustrojów jonami metali dwuwartościowych do ich dalszej szybkiej i dokładnej identyfikacji. Kolejnym aspektem prowadzonych badań była identyfikacja mechanizmów uczestniczących w procesie neutralizacji mykotoksy – zearalenone (ZEA). Ostatnią podjętą w rozprawie kwestią było zbadanie mechanizmów wiązania antybiotyków na powierzchni biologicznie syntezowanych nanocząstek srebra, a następnie ocena ich właściwości antybakteryjnych.

Wstępny etap badań polegał na opracowaniu metody izolacji i identyfikacji mikroorganizmów z wykorzystaniem metod biologii molekularnej oraz techniki spektrometrycznej. Następnie dokonano opisu właściwości powierzchniowych testowanych biokoloidów poprzez identyfikację ich ładunków powierzchniowych w różnych warunkach pH oraz aktywnych powierzchniowych grup funkcyjnych z wykorzystaniem technik spektroskopowych i potencjometrycznych. Znajomość powierzchniowych grup funkcyjnych i ładunków badanych indywidualnie pozwoliła na dobór odpowiednich warunków do przeprowadzenia dalszych eksperymentów. W kolejnym etapie dokonano opisu natury procesu biosorpcji z wykorzystaniem klasycznych badań kinetycznych. Otrzymane dane eksperymentalne skonfrontowano z wybranymi modelami teoretycznymi takimi jak model kinetyki zerowego, pseudo-pierwszego i pseudo-drugiego rzędu, a także modelem wewnątrzcząsteczkowej dyfuzji Webera-Morrisa. W przypadku oceny natury biosorpcji zearalenone przez komórki mikroorganizmów dowiedziono, że proces ten jest ściśle zależny od zastosowanego szczepu, a także warunków jego hodowli. Mechanizmy uczestniczące w tym procesie obejmowały zależnie od gatunku powierzchniową adsorpcję, transport toksyny do wnętrza komórki i tam późniejszą jej akumulację oraz metabolizm do zredukowanych form ZEA. Z kolei badania nad sorpcją antybiotyków przez biologicznie syntezowane nanocząstki srebra wykazały, że jest to proces złożony, a jego przebieg jest zależny od struktury chemicznej zastosowanego antybiotyku. Zasadniczy etap pracy stanowiło porównanie danych otrzymanych za pomocą klasycznych modeli sorpcji z danymi uzyskanymi z wykorzystaniem technik instrumentalnych. Takie podejście pozwoliło na otrzymanie lepszego wglądu w zjawiska zachodzące na granicy faz. Technika spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera pozwoliła na identyfikację powierzchniowych grup funkcyjnych biokoloidów uczestniczących w procesie. Można stwierdzić, iż w przypadku sorpcji jonów wapnia przez komórki drożdży główny udział mają grupy fosforanowe, karboksylowe i aminowe. W wiązaniu ZEA przez probiotyczne komórki bakterii dominującą rolę pełnią zdeprotonowane grupy karboksylowe. Natomiast za wiązanie antybiotyków na powierzchni biologicznie syntezowanych nanocząstek srebra odpowiedzialne są aktywne grupy funkcyjne aminokwasów, które budują ich zewnętrzny płaszcz organiczny. Badania potencjału zeta pozwoliły na określenie wpływu procesu sorpcji na stabilność badanych biokoloidów, a zastosowanie techniki dynamicznego rozpraszania światła umożliwiło określenie zmian w rozkładzie ich hydrodynamicznego rozmiaru. Zastosowanie spektrometrii mas z laserową jonizacją próbki wspomaganą matrycą z tandemowym analizatorem czasu przelotu (MALDI TOF-TOF MS) ujawniło zmiany na poziomie molekularnym zachodzące w wyniku biosorpcji. Z kolei mikroskopia fluorescencyjna umożliwiła określenie wpływu sorpcji zearalenonu na żywotność mikroorganizmów w trakcie procesu oraz obserwację agregacji komórek drożdży pod wpływem jonów wapnia w różnych warunkach pH.

Finalnie powierzchniowa modyfikacja komórek drożdży jonami wapnia w ściśle określonych warunkach pozwoliła na ich efektywną separację elektroforetyczną. Znajomość efektywności i mechanizmów uczestniczących w sorpcji zearalenonu przez komórki mikroorganizmów umożliwiła selekcję odpowiednich szczepów i warunków ich hodowli w celu zastosowania ich liofilizatów jako składników bezpiecznych neutralizatorów tej toksyny z pasz i surowców spożywczych. Natomiast otrzymane nanocząstki z zaadsorbowaną na powierzchni warstwą antybiotyków zostały przetestowane pod kątem mechanizmów zaangażowanych w ich antybakteryjne właściwości.

Agnieszka Rogowska  
11.05.2020

## Abstract

In presented doctoral dissertation, the sorption mechanisms and abilities of biocolloids systems such as cells of living microorganisms and biologically synthesized silver nanoparticles were examined. Research on the description of sorption processes occurring on the surface of biocolloids were performed on three planes. The first one was to developed the method for microbiological sample preparation by surface modification of wild microorganisms strains with divalent metal ions for their further rapid and accurate identification. Another aspect of the research was the identification of mechanisms involved in the process of mycotoxin - zearalenone (ZEA) neutralization. The last issue raised in the dissertation was to examine the mechanisms of antibiotics binding on the surface of biologically synthesized silver nanoparticles, and then evaluation their antibacterial properties.

The initial stage of research was to develop a method for microorganisms isolation and identification using molecular biology methods and spectrometric techniques. Then, the surface properties of the tested biocolloids were described by identification of their surface charges under various pH conditions and active surface functional groups by spectroscopic and potentiometric techniques. Knowledge of surface functional groups and charges of the examined individuals allowed for selection of appropriate conditions for the further experiments. In the next stage, the nature of the biosorption process was described using classical kinetic studies. The obtained experimental data were confronted with selected theoretical models such as the zero, pseudo-first and pseudo-second order kinetics models, as well as the Weber-Morris intraparticle diffusion model. In the case of examination the nature of zearalenone biosorption by microorganism cells, it was proved that this process is strictly dependent on the used strain, as well as the conditions of its culturing. Depending on the species, the mechanisms involved in this process included surface adsorption, transport of the toxin into the cell and then its intracellular accumulation, as well as metabolism to reduced ZEA forms. In turn, research on the sorption of antibiotics by biologically synthesized silver nanoparticles has shown that it is a complex process and its behavior depends on the chemical structure of the used antibiotic. The main stage of work was the comparison of data obtained using classical sorption models with data obtained using instrumental techniques. This approach allowed for better insight into the phenomena occurring at the interface. The infrared spectroscopy with Fourier transformation technique has allowed the identification of surface functional groups of biocolloids participating in the process. It can be stated that the phosphate, carboxyl and amino groups have the main share in the calcium ions sorption by yeast cells. In turn, deprotonated carboxyl groups play a dominant role in ZEA binding by probiotic bacterial cells. In contrast, active amino acid functional groups that build outer organic coat of biologically synthesized silver nanoparticles are response for antibiotics binding on the nanoparticles surface. Zeta potential measurements allowed to determine the impact of the sorption process on the stability of the tested biocolloids, and the application of dynamic light scattering techniques allowed for determination of changes in the distribution of their hydrodynamic size. The use of matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF-TOF MS) revealed changes resulting from biosorption at the molecular level. In turn, fluorescence microscopy, made it possible to determine the effect of zearalenone sorption on the viability of microorganisms during the process and to observe the aggregation of yeast cells under the influence of calcium ions at various pH conditions.

Finally, surface modification of yeast cells with calcium ions under specific conditions allowed for their effective electrophoretic separation. Knowledge of the efficiency and mechanisms involved in the sorption of zearalenone by the cells of microorganisms has enabled the selection of appropriate strains and the conditions of their culturing in order to use their lyophilisates as components of safe neutralizers of this toxin from feed and food raw materials. Whereas, the obtained nanoparticles with a layer of antibiotics adsorbed on their surface were tested for mechanisms involved in their antibacterial properties.

Agnieszka Rogowska  
11.05.2020