

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
INSTYTUT INŻYNIERII CHEMICZNEJ
I URZĄDZEŃ CIEPLNYCH

P R A C A D O K T O R S K A

**USUWANIE JONÓW METALI CIĘŻKICH
PRZEZ MIKROALGI *Spirulina sp.*
W PROCESACH BIOSORPCJI I BIOAKUMULACJI**

mgr inż. Katarzyna Chojnacka

Promotor:

prof. dr hab. inż. Andrzej Noworyta

Wrocław, 2003

Składam serdeczne podziękowania
prof. dr hab. inż. Andrzejowi Noworycie
za umożliwienie realizacji własnych pomysłów
badawczych, za pomoc w ukierunkowaniu pracy oraz za
stworzenie sprzyjających warunków do jej wykonania.
Dziękuję również wszystkim, którzy przyczynili się do
powstania niniejszej pracy.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	1
2. USUWANIE JONÓW METALI CIĘŻKICH ZE ŚCIEKÓW METODAMI MIKROBIOLOGICZNYMI	4
2.1 PORÓWNANIE METOD TRADYCYJNYCH Z BIOLOGICZNYMI	6
2.2 BIOSORPCJA	8
2.2.1 Podstawy procesu biosorpcji	8
2.2.2 Biosorbenty	9
2.2.3 Czynniki wpływające na biosorpcję	9
2.2.4 Mechanizm procesu biosorpcji	10
2.2.5 Odzysk związanego z biomasą metalu i regeneracja biomasy	13
2.2.7 Mikroalgi - biosorbenty posiadające wiele zalet	14
2.2.8 Urządzenia do biosorpcji	14
2.3 BIOAKUMULACJA	15
2.3.1 Podstawy procesu bioakumulacji	15
2.3.2 Bioakumulanty	16
2.3.3 Czynniki wpływające na bioakumulację	16
2.3.4 Mechanizm procesu bioakumulacji	17
2.3.5 Mikroalgi jako bioakumulanty	21
2.3.6 Urządzenia do bioakumulacji	22
2.4 PORÓWNANIE BIOSORPCJI I BIOAKUMULACJI	22
3. MIKROALGI SPIRULINA	25
3.1 CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA	25
3.2 SYSTEMATYKA	26
3.3 SPIRULINA	26
3.3.1 Charakterystyka ogólna	26
3.3.2 Morfologia, ultrastruktura i taksonomia	27
3.4 METABOLIZM MIKROALG	30
3.4.1 Pojęcia podstawowe	30
3.4.2 Fotoautotrofia - fotosynteza	31
3.4.3 Heterotrofia i miksotrofia	32
3.4.4 Stechiometria wzrostu mikroalg	35
4. HODOWLA BIOMASY	36
4.1 CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WZROST	36
4.1.1 Światło	36
4.1.2 Źródło węgla	38
4.1.3 Źródło azotu	39
4.1.4 Składniki mineralne	40
4.1.5 Inne czynniki wpływające na wzrost	40
4.2 MODEL WZROSTU	41
4.2.1 Hodowla okresowa	41
4.3 FOTOBIOREAKTORY	44
4.4 TECHNOLOGIA PRODUKCJI MIKROALG ORAZ ICH BIOTECHNOLOGIA ŚRODOWISKOWA	45
4.4.1 Produkcja masowa biomasy mikroalg - aspekty technologiczne	45
4.4.2 Próby zwiększenia produktywności biomasy	46
4.4.3 Zastosowanie mikroalg w biotechnologii środowiskowej	46
5. CEL I ZAKRES PRACY	48

5.1 CEL PRACY	48
5.2 ZAKRES PRACY	49
5.3 OPIS OGÓLNY TEMATU	50
6. MATERIAŁY I METODY	53
6.1 ODCZYNNIKI	53
6.2 APARATURA	53
6.3 MATERIAŁ BADAWCZY	54
6.4 POŻYWKA HODOWLANA	55
6.5 STERYLIZACJA	55
6.6 INOCULUM	55
6.7 HODOWLA BIOMASY	55
6.8 METODY ANALITYCZNE	56
6.9 BIOSORPCJA	63
6.10 BIOAKUMULACJA	67
6.11 OCZYSZCZANIE ŚCIEKÓW PRZEMYSŁOWYCH	68
7. HODOWLA BIOMASY	69
7.1 HODOWLA AUTOTROFICZNA	69
7.1.1 Natężenie światła w reaktorze	69
7.1.2 Kinetyka wzrostu mikroorganizmów	73
7.1.3 Statyka wzrostu mikroorganizmów	81
7.2 HODOWLA HETEROTROFICZNA	87
7.2.1 Kinetyka wzrostu mikroorganizmów	87
7.2.2 Statyka wzrostu mikroorganizmów	92
7.3 HODOWLA MIKSOTROFICZNA	97
7.3.1 Kinetyka wzrostu mikroorganizmów	97
7.3.2 Statyka wzrostu mikroorganizmów	104
8. BIOSORPCJA	111
8.1 KINETYKA BIOSORPCJI JONÓW METALI CIĘŻKICH	112
8.2 STATYKA PROCESU BIOSORPCJI	112
8.3 POWIERZCHNIA SORPCYJNA KOMÓREK	116
8.4 MECHANIZM PROCESU BIOSORPCJI	119
8.5 KWASOWO-ZASADOWA CHARAKTERYSTYKA POWIERZCHNI SPIRULINA SP.	123
8.6 WYZNACZENIE STAŁYCH WIAZANIA METALU DO POSZCZEGÓLNYCH GRUP FUNKCYJNYCH ZNAJDUJĄCYCH SIĘ NA POWIERZCHNI KOMÓRKI.	128
8.7 DESORPCJA JONÓW METALU ZWIĄZANYCH Z BIOMASĄ	130
8.8 CHEMICZNA MODYFIKACJA GRUP FUNKCYJNYCH NA POWIERZCHNI KOMÓRKI	132
8.9 WPŁYW PARAMETRÓW HODOWLI NA POJEMNOŚĆ BIOSORPCYJNĄ KOMÓREK	132
9. BIOAKUMULACJA	135
9.1 WPŁYW OBECNOŚCI JONÓW METALU NA KINETYKĘ WZROSTU	135
9.2 WPŁYW OBECNOŚCI JONÓW METALU NA STATYKĘ WZROSTU	138
9.3 MECHANIZM PROCESU BIOAKUMULACJI	142
9.3 KINETYKA USUWANIA JONÓW METALI CIĘŻKICH	144
9.4 MODEL PROCESU BIOAKUMULACJI	146
9.5 POJEMNOŚĆ BIOAKUMULACYJNA	150
10. OCZYSZCZANIE ŚCIEKÓW PRZEMYSŁOWYCH PRZEZ	154

MIKROALGI <i>Spirulina</i> sp.	
10.1 OCZYSZCZANIE PRZYKŁADOWYCH ŚCIEKÓW PRZEMYSŁOWYCH	154
10.2 UKŁAD SEPARACJI KOMÓREK	159
10.3 KONFIGURACJA INSTALACJI TECHNOLOGICZNYCH OCZYSZCZANIA ŚCIEKÓW Z JONÓW METALI CIĘŻKICH W PROCESACH BIOSORPCJI ORAZ BIOAKUMULACJI	161
11. PODSUMOWANIE	164
11.1 HODOWLA BIOMASY	164
11.2 BIOSORPCJA	169
11.3 BIOAKUMULACJA	171
11.4 OCZYSZCZANIE ŚCIEKÓW PRZEMYSŁOWYCH	172
12. WNIOSKI	174
13. SPIS SYMBOLI I INDEKSÓW	176
14. LITERATURA	178

1. WSTĘP

Wiedza o szkodliwym wpływie metali ciężkich oraz ich uciążliwości dla środowiska i zdrowia ludzi powstała w ostatnich latach i jest efektem wykorzystania nowych i czułych metod ich identyfikacji. Specyfika problemu leży w braku możliwości degradacji tych zanieczyszczeń, albowiem jedyną metodą ich unieszkodliwienia jest zateżnienie i sprowadzenie do postaci mniej ruchliwej. Sprawia to jednak trudności w przypadku gdy jony metali pozostają w formie rozproszonej w roztworach o dużej objętości i niskim stężeniu.

W środowisku naturalnym, metale podlegają cyklowi obiegu. Niezależnie od tego, czy pozostają w postaci jonowej w środowisku wodnym, czy związanej, nadal są biologicznie dostępne i toksyczne. Jedną z negatywnych konsekwencji rozwoju przemysłowego jest uwalnianie jonów metali ciężkich ze stosunkowo obojętnych złóż mineralnych do chemicznie dostępnych form w biosferze. Naturalnie zachodzące procesy geochemiczne dodatkowo pogorszyły ten problem, powodując zagrożenie zarówno dla ludzi jak i całych ekosystemów. Jedyną skuteczną metodą wydzielenia metali z obiegu w środowisku jest ich wyodrębnienie w technologiach oczyszczania ścieków.

Istnieje wiele technik oczyszczania ścieków z jonów metali ciężkich. Jednak tradycyjne metody ich usuwania często nie spełniają ustawowych wymogów w zakresie dopuszczalnych stężeń dla ścieków zrzucanych do wód powierzchniowych, jak również sprawiają wiele trudności technologicznych, do których należą problemy związane z zagospodarowaniem i składowaniem powstających odpadów wtórnych [282].

W przypadku opracowywania nowych metod oczyszczania ścieków, wydajne rozwiązania można oprzeć na obserwacji środowiska naturalnego i procesów w nim zachodzących. Przeprowadzając naturalnie zachodzące reakcje w zamkniętym, w pełni kontrolowanym systemie, możliwe będzie wykorzystanie biocząsteczek i ich naturalnej zdolności wiązania zanieczyszczeń w przemysłowych procesach usuwania jonów metali ciężkich ze ścieków. Znajdujące się na podstawowym miejscu łańcucha troficznego, algi (jako bioakumulanty), w ich naturalnym środowisku życia, zateżniają jony metali ciężkich w swej biomacie. Stanowiąc pokarm dla organizmów znajdujących się na wyższym miejscu łańcucha troficznego, mogą wywołać efekt toksyczny. W tym przypadku rola alg jako bioakumulantów jest niekorzystna i niebezpieczna. Natomiast w procesie kontrolowanym powinna istnieć możliwość oczyszczania wód i ścieków, zawierających niskie stężenia tych jonów w warunkach kontrolowanych. Literatura podaje, że współczynnik zateżniania wynosi kilka-kilkanaście tysięcy. Jeżeli zakumulowany metal jest cenny, wówczas istnieje możliwość

jego odzysku, co byłoby niemożliwe w przypadku roztworów o bardzo niskim stężeniu. Rozpatrując oddziaływanie alg i jonów metali ciężkich należy dodatkowo zwrócić uwagę, że w przeciwieństwie do związków organicznych (herbicydów, pestycydów i innych biodegradowalnych toksyn), metale ciężkie nie mogą zostać rozłożone przez organizmy żywe, ale jedynie zateżone [143, 150-152].

W wielu ośrodkach naukowych obecnie trwają badania nad zastosowaniem metod mikrobiologicznych jako technik wiązania i akumulacji metali. Metody te mogą służyć jako cenne narzędzie usuwania metali uznawanych za toksyczne ze ścieków przemysłowych (np. arsen, rtęć, kadm, chrom, nikiel, cynk, miedź i in.) lub odzyskiwania metali szlachetnych, takich jak np. złoto (z wody morskiej) [19, 281].

Już wiele lat temu zaobserwowano zdolność organizmów, takich jak bakterie [174, 176, 191, 229], drożdże [178, 210, 229], czy algi [14, 75, 89, 91, 128, 144, 178, 231, 294] do akumulacji obecnych w środowisku metali ciężkich. W procesach tych stosuje się dwa rozwiązania: [214, 283-289]:

- **biosorpcja** (ang. *biosorption*) - w odniesieniu do nieżywej biomasy
- **bioakumulacja** (ang. *bioaccumulation*) - wiązanie jonów metali ciężkich przez organizmy żywe

W procesie *biosorpcji* wykorzystuje się materiały biologiczne do pasywnego (pod względem metabolicznym) wiązania jonów metali ciężkich z roztworów wodnych [74]. Jony metalu wiążą się do powierzchni biosorbenta. Jest to proces szybki, o charakterze fizykochemicznym, zachodzący na powierzchni komórki, zależny od budowy ściany komórkowej [282]. Nową, obiecującą generację sorbentów stanowią biosorbenty: erytrocyty [91], bakterie [88, 89], algi [175, 215], drożdże [80], grzyby [90, 105, 300] i materiały roślinne [221]. Stopień specyficzności danego biosorbenta w stosunku do danego metalu jest różnicowany [167, 252].

W procesie *bioakumulacji* jony metali wiązane są przez żyjące organizmy (proces aktywny metabolicznie). Związana jest ze wzrostem mikroorganizmu w środowisku zawierającym jony metali ciężkich. W takiej sytuacji dochodzi do ich akumulacji wewnątrz komórki [169, 282]. Główną zaletą stosowania żywej biomasy jest jej odnawialność. W procesie bioakumulacji jony metalu początkowo wiążą się do powierzchni bioakumulanta, a następnie są transportowane do wnętrza komórek. Transport aktywny do wnętrza komórki może prowadzić do bardziej wydajnej akumulacji (stężenie metalu w oczyszczonym ścieku jest bardzo niskie), ponadto wydzielane na zewnątrz komórki produkty metaboliczne mogą wspomagać proces.

W większości przypadków praca z biomasą nieżywą ma więcej zalet [91, 112] i znalazła już pierwsze zastosowania w skali przemysłowej. Niewiele jednak wiadomo o mechanizmie procesu i czynnikach na niego wpływających. Zastosowanie nieżywej biomasy w procesie biosorpcji pozwoli na uniknięcie problemu toksyczności metalu dla komórki. Biosorpcja jest procesem szybszym, ponieważ zachodzi wiązanie przez ścianę komórkową, z wyłączeniem transportu do wnętrza komórki. Kolejną zaletą stosowania biosorpcji jest prostota i możliwość niedestrukcyjnej regeneracji biomasy, co umożliwi ponowne jej wykorzystanie. W procesie bioakumulacji natomiast metal jest zakumulowany wewnątrz komórki. Jest zatem trudny w odzyskaniu: można go usunąć z biomasy jedynie poprzez rozerwanie lub spalenie komórek. Wówczas biomasa nie może zostać zregenerowana i wykorzystana ponownie.

Literatura przedstawia mikroalgi (cyjanobakterie) jako efektywne biosorbenty. Jest to grupa alg bardzo podobna pod względem anatomicznym i fizjologicznym do roślin wyższych. Jako jedyne prokariota są zdolne do prowadzenia fotosyntezy. Mogą zasiedlać środowiska, w których panują warunki nie sprzyjające dla rozwoju większości organizmów [89]. Ich komórki wykazują zdolność selektywnego wiązania jonów metali i ich akumulacji wewnątrz komórki. Ze względu na wszechobecność w środowisku były intensywnie badane mimo, że ich hodowla oraz metabolizm nie zostały wystarczająco poznane. Ponieważ wzrost alg doskonale odzwierciedla warunki środowiskowe oraz jego zmiany [12], dlatego znalazły zastosowanie w monitoringu zanieczyszczenia środowisk wodnych. W ostatnich latach weszły na rynek produkty biosorpcyjne bazujące na biomasie alg pod handlowymi nazwami AlgaSORB® i AMT-Biocclaim™ [58]. AlgaSORB® to preparat zawierający immobilizowaną w matrycy polimerowej biomasę mikroalg (m.in. *Chlorella sp.* i *Spirulina sp.*): umożliwia oczyszczanie ścieków z wydajnością 90 % dla stężenia początkowego kadmu 0,16 mg/kg, 10 g/dm³ TDS, przy przepływie 30 dm³/min [144].

Nowe procesy biotechnologiczne wykorzystujące biomasę do usuwania jonów metali ciężkich z pewnością są rozwiązaniami perspektywnymi, które mogą zapewnić skuteczne oczyszczanie ścieków jednocześnie pozwalając na obniżenie kosztów procesu.

I.

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2. USUWANIE JONÓW METALI CIĘŻKICH ZE ŚCIEKÓW METODAMI MIKROBIOLOGICZNYMI

Jednocześnie z upowszechnieniem się terminu „metale ciężkie”, nastąpiła znaczna ewolucja definicji. Po raz pierwszy określenie to pojawiło się w 1936 roku (definicja Bjerrum’a), którym zdefiniowano metale o gęstości powyżej 7 g/cm^3 . Na przestrzeni lat definicja ta była modyfikowana przez wielu autorów i w chwili obecnej brak jednoznaczności w tej materii. Aktualnie literatura podaje 40 różnych definicji, które dzieli na 5 grup, opierających się na [73, 110, 282]: gęstości (ciężarze właściwym), masie (ciężarze) lub liczbie atomowej, innych właściwościach chemicznych oraz toksyczności.

Termin „metal ciężki” nigdy nie został jednoznacznie zdefiniowany przez żadną z organizacji zajmujących się nomenklaturą chemiczną, np. IUPAC. W ciągu ponad 60 lat, terminowi temu przypisywano taką wielość znaczeń, że w chwili obecnej pojęcie to utraciło jakiegokolwiek sens i ma raczej charakter popularnonaukowy. Nie znaleziono związku pomiędzy gęstością lub inną koncepcją fizykochemiczną, którą wykorzystywano do definiowania metali ciężkich oraz przypisywaną im toksycznością lub ekotoksycznością [73]. Zrozumienie biodostępności jest kluczem do określenia potencjalnej toksyczności metalu i jego związków. Biodostępność zależy bowiem od czynników biologicznych oraz fizykochemicznych właściwości metalu, jego jonów i związków. Większość spełniających kryteria definicji metali ciężkich to tzw. pierwiastki przejściowe z niecałkowicie wypełnionymi orbitalami d, a więc mające tendencję do tworzenia kompleksów. Kationy metali ciężkich odgrywają istotną rolę jako „pierwiastki śladowe” w wyszukanych przemianach biochemicznych. Jednak w wyższych stężeniach, jony metali ciężkich tworzą niespecyficzne związki kompleksowe w komórce, które prowadzą do wystąpienia efektów toksycznych. Niektóre kationy metali, np. Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^{+} tworzą silnie toksyczne kompleksy, które są zbyt niebezpieczne by mieć jakąkolwiek fizjologiczną funkcję. Nawet uważane za mikroelementy i potrzebne komórce jony Ni^{2+} , Cu^{2+} są toksyczne w wyższych stężeniach. Dlatego komórki wytworzyły pewne mechanizmy chroniące, aby obronić się przed obecnymi w środowisku metalami [12].

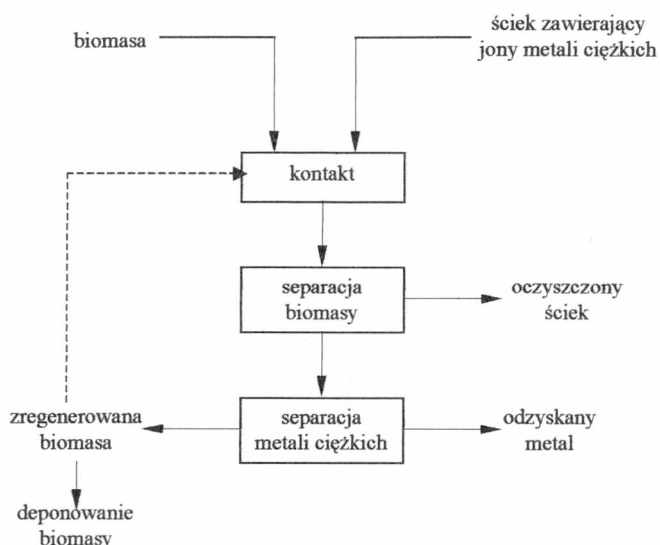
W niniejszej pracy terminem „metale ciężkie” będą określane metale uznawane za toksyczne, najczęściej dzielone na dwie grupy [73]: 1) potrzebne organizmom w ilościach śladowych, ale toksyczne w wyższych stężeniach (As, Cr, Co, Cu, Ni, Va, Zn) oraz 2) wysoce toksyczne, nie pełniące pozytywnej roli w organizmach żywych (Pb, Hg, Cd, Ur, Ag, Be).

Ażeby wywołać efekt fizjologiczny lub toksyczny, jon musi zostać wprowadzony do komórki. Większość kationów metali jest strukturalnie do siebie podobna, mają średnicę 130-

$160 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}$ [169], przez co kationy toksyczne są omyłkowo wprowadzane do komórki systemami transportującymi metale potrzebne (np. kanałami transportu jonów wapnia lub magnezu).

Wykorzystanie mikroorganizmów do usuwania jonów metali ciężkich może stać się interesującą alternatywą w stosunku do już istniejących metod [302], zwłaszcza że ich efektywność nie jest zadowalająca. Zastosowanie odnawialnej biomasy do oczyszczania dużych objętości ścieków o niskim stopniu zanieczyszczenia (przy obecności innych zanieczyszczeń: zarówno organicznych jak i nieorganicznych - np. jonów wapnia lub magnezu) pozwoli na wielokrotne zatężenie ścieku, co znacznie ułatwi zagospodarowanie. W przeciwieństwie do większości metod tradycyjnych, w procesach mikrobiologicznych nie istnieje konieczność stosowania kosztownych, agresywnych reagentów w dużych ilościach. Powstający w procesie szlam (biomasa związana z jonami metalu) będzie można zregenerować odpowiednimi eluentami lub dodatkowo zatężyć poprzez spoielenie. W dyskusji nad cechami metod mikrobiologicznych konieczne jest rozróżnienie technik na biosorpcyjne i bioakumulacyjne. Biosorpcja jest mniej kosztowna inwestycyjnie i operacyjnie oraz mniej wymagająca (szeroki zakres pH (3-9) i temperatury (4-60 °C)) w porównaniu do procesu bioakumulacji, którego parametry są zdeterminowane wymaganiami wzrostowymi danego szczepu mikroorganizmu. Jony metalu są związane w procesie biosorpcji w sposób odwracalny, dlatego powinna istnieć możliwość odzyskania jonów metali i regeneracji biomasy. W przypadku bioakumulacji jony znajdujące się wewnątrz komórki będzie można odzyskać tylko metodami destrukcyjnymi [112, 140-143, 281].

Na Rys. 2.1 przedstawiono koncepcję biουςuwania metali ciężkich. Biomasa jest w kontakcie z jonami danego metalu przez krótki okres czasu lub jest hodowana w jego obecności, następnie oddzielana od fazy ciekłej, regenerowana lub deponowana. Istnieje szereg parametrów związanych z projektowaniem procesu biουςuwania, m.in. wybór szczepu, metody hodowli lub obróbki wstępnej biomasy [135-138]. Badania nad procesem biουςuwania obejmują wzrost komórek oraz wiązanie jonów metali. Niezbędny jest dobór odpowiedniego pH, stężenia biomasy oraz czasu kontaktu. Metodyka badawcza powinna również obejmować separację biomasy, elucję oraz odzysk metalu i ponowne wykorzystanie lub zdeponowanie biomasy [112].



Rys. 2.1

Zasada usuwania jonów metali z roztworów wodnych przy udziale mikroorganizmów [89]

2.1 Porównanie metod tradycyjnych z biologicznymi

W ciągu ostatnich lat, limity dopuszczalnych stężeń w ściekach uległy znacznemu obniżeniu, nawet do poziomu 0,5-1,0 mg/kg (Tabela 2.1.1). Spowodowało to, że tradycyjnie stosowane metody oczyszczania z jonów metali ciężkich, takie jak strącanie czy adsorpcja, stały się niewystarczające i zbyt kosztowne. W przypadku strącania wodorotlenków metali niezbędne jest dodanie dużych ilości alkaliów celu zwiększenia pH. Zazwyczaj wykorzystywany jest wodorotlenek sodu lub wapno w połączeniu z czynnikami redukującymi lub flokulującymi. Metody te generują powstawanie trudnych do zagospodarowania szlamów odpadowych. Następnie ścieki poddaje się neutralizacji. Procedura taka prowadzi do zwiększenia objętości ścieków oraz do zwiększenia stopnia zasolenia. Metoda charakteryzuje się niską wydajnością, selektywnością oraz wysokimi kosztami. Nie istnieje możliwość regeneracji użytych chemikaliów. Jakość oczyszczonego ścieku jest ściśle związana ze stężeniem początkowym zanieczyszczeń. Wymiana jonowa natomiast charakteryzuje się wysokimi kosztami, brakiem tolerancji na związki organiczne oraz koniecznością wykorzystania dużych ilości wymienniczy jonowych, które następnie regeneruje się kwasem. W przypadku stosowania jonitów istnieje problem obecności zanieczyszczeń mechanicznych. Implikuje to konieczność filtracji na złożu, co prowadzi do utraty drożności. W przypadku stosowania wymiany jonowej występuje poważny problem niespecyficzności żywic, które szybko ulegają wysyceniu kationami odpowiedzialnymi za twardość wody (Ca^{2+} , Mg^{2+}) oraz kationami jednowartościowymi (Na^+ , K^+) - trzeba je często regenerować [112]. Adsorpcja na klasycznych sorbentach, np. węgla aktywnym to metoda, której działanie jest związane ze stopniem zanieczyszczenia ścieku wyjściowego. Charakteryzuje się niską selektywnością i

wydajnością. Usuwanie zanieczyszczeń poprzez odparowanie, podobnie jak strącanie czy sorpcja na węglu aktywnym, charakteryzuje się niską selektywnością i wydajnością. Jest metodą kosztowną, w której nie istnieje możliwość odzysku poniesionych środków [282]. W porównaniu do metod usuwających jony metali ciężkich ze ścieków przemysłowych, takich jak strącanie wapnem, wymiana jonowa, czy strącanie biosiarczkami (H_2S wytwarzany przez bakterie redukujące siarczany), biosorpcja posiada takie zalety jak niskie koszty operacyjne, minimalizację ilości powstających szlamów (chemicznych i biologicznych), wysoką wydajność przy detoksykacji bardzo rozcieńczonych ścieków [135-138]. Biosorbenty natomiast są na tyle kompleksowym materiałem, że jony metali są wiązane w sposób specyficzny i nie następuje wysycenie jonami, które są obecne w wodzie w wysokich stężeniach.

Tabela 2.1.1
Limity dopuszczalnych stężeń wybranych jonów metali ciężkich w ściekach wprowadzanych do wód i do ziemi w mg/kg

jon metalu	wg EPA [78]	wg polskiego prawodawstwa [232]
chrom (III)	2,93	0,5
kadm (II)	0,111	0,1
miedź (II)	1,45	0,5

Problemy te sprawiły, że koniecznością stało się poszukiwanie nowych metod, adekwatnych do pracy przy stężeniach bardzo niskich. Obiecujące mogą się okazać metody biosorpcyjne, gdyż biosorbenty posiadają znacznie wyższą pojemność sorpcyjną w funkcji równowagowego stężenia jonów metalu (maksymalna ilość metalu związanego przez jednostkę masy sorbenta, mg metalu/g sorbenta) niż inne sorbenty, np. glinokrzemiany, węgle aktywne czy wymiennicze jonowe. Biosorpcja jest zaliczana do metod selektywnych, wydajnych i uniwersalnych, niewrażliwych na obecność związków organicznych. W Tabeli 2.1.2 przedstawiono porównanie wydajności różnych sorbentów - materiałów wiążących jony metali ciężkich. Sorbenty są charakteryzowane zależnością pojemności biosorpcyjnej (q) w funkcji stężenia równowagowego (C_{eqMe}). Wobec niepełnych danych literaturowych, prezentowane zestawienie nie określa maksymalnej pojemności biosorpcyjnej ani charakteru tej zależności, a jedynie punkt na krzywej $q=f(C_{eqMe})$. Możliwe jest tylko oszacowanie stopnia usunięcia jonów Cr^{3+} przy danym stężeniu sorbenta oraz sorbatu.

Tabela 2.1.2
Porównanie sorbentów stosowanych do usuwania jonów Cr(III)

sorbent	c sorbenta [g/dm ³]	C ₀ Cr [mg/kg]	C _{eq} Cr [mg/kg]	q [mg/g]	
australijski węgiel aktywny	20	50	1	2,45	[148]
spreparowany węgiel aktywny	10	275	200	7,5	[1]
węgiel aktywny	3	22,1	5	5,7	[161]
wymieniacz jonowy - makroporowata żywica karboksylowa Purolite C106	530	100	10	0,17	[269]
prażona glina (1)	128	9,4	0,02	0,07	[222]
prażona glina (1)	128	985	448	4,2	[222]
tlenek krzemu i glinu	10	2	0,2	0,18	[54]
krzemionka	10	0,52	0,16	0,036	[55]
granulowany sorbent polietylenoiminowy Chelex 100	1,8	260	189	39,4	[23]
alginian wapnia	5,2	400	16	80	[8]
kłaczujące drożdże piwne (1)	4,5	10	2,6	1,64	[80]
kłaczujące drożdże piwne (2)	4,5	100	38	13,8	[80]
chitosan				92	[9]
kora drzew				19,5	[9]
wełna				17	[9]
ksantogenian				19,7	[9]
mech naturalny	2	20	5,4	4,3	[148]
<i>Spirulina sp.</i> (forma autotroficzna)	0.5	125	72	106	[37]

2.2 Biosorpcja

Mimo, że biosorpcja nie jest zjawiskiem nowym, jest aktualnie dyskutowana w literaturze. Ostatnie badania nad biosorpcją jonów metali skupiły się nad wyjaśnianiem mechanizmów i praw nią rządzących. Biosorpcję najczęściej bada się na układach uproszczonych, zawierających pojedynczy jon metalu [283]. W literaturze podaje się, że na mechanizm wiązania jonów metalu w procesie biosorpcji składać się mogą takie procesy jak: adsorpcja, kompleksowanie, oddziaływania elektrostatyczne czy wymiana jonowa [286].

2.2.1 Podstawy procesu biosorpcji

W biosorpcji przebiega pasywne (pod względem metabolicznym) wiązanie jonów metalu do powierzchni komórek, a więc proces ten jest ściśle związany z charakterem ściany komórkowej (powierzchni wiążącej), jej naturą fizykochemiczną. Wydajność biosorpcji zależy przede wszystkim od rodzaju biosorbenta i sorbatu [195-197].

Przez wiele lat uważano, że mechanizmem procesu biosorpcji jest adsorpcja [284]. Stąd równowagę procesu opisywano izotermami Langmuira, rzadziej Freundlicha [281]. W świetle ostatnich badań mechanizm ten ma charakter złożony, zależny od szczepu mikroorganizmu, przy istotnym udziale wymiany jonowej, a nie adsorpcji [30, 32, 34].

2.2.2 Biosorbenty

Chociaż wiele materiałów biologicznych wiąże metale ciężkie, tylko materiały posiadające wystarczająco wysoką pojemność biosorpcyjną i selektywność w stosunku do metali ciężkich są odpowiednie do ewentualnego zastosowania procesu biosorpcji w skali

przemysłowej. Zbadano wiele różnych biomateriałów pod kątem ich zastosowań biosorpcyjnych. Biomasa wykazuje wysoką pojemność biosorpcyjną (rzędu 100 mg/g lub 1 mmol/g). Najczęściej wymieniane klasy biosorbentów to algi, bakterie i grzyby. Pozostałe to torf, substancje pektynowe oraz materiały celulozowe (np. trociny) (Tabela 2.2.1). W Tabeli 2.2.2 przedstawiono gatunki organizmów posiadające zdolność wiązania metali porównywalną z handlowymi żywicami kationowymiennymi.

Tabela 2.2.1

Biosorbenty i ich pojemność biosorpcyjna w stosunku do jonów Cr(III), Cd(II) i Cu(II) [106, 107, 137, 138, 177, 235, 274, 286]

jon metalu	mikroorganizm	klasa biomasy	maksymalna pojemność biosorpcyjna (meq Me/g s.m. komórek)
Cr ³⁺	<i>Bacillus</i> - biomasa	bakterie	6.81
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	grzyby	1.79
	<i>Candida tropicalis</i>	drożdże	0.265
	<i>Streptomyces nouresei</i>	nitkowate bakterie	0.104
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	grzyby	0.019
Cd ²⁺	<i>Ascomyllum nodosum</i>	algi - brunatnice	3.83
	<i>Sargassum natans</i>	algi - brunatnice	2.40
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	drożdże	1.53
	<i>Fucus vesiculosus</i>	algi - brunatnice	1.30
	<i>Candida tropicalis</i>	drożdże	1.07
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	grzyby	0.996
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	grzyby	0.534
	<i>Rhizopus nigricans</i>	grzyby	0.338
	<i>Penicillium spinulosum</i>	grzyby	0.007
	<i>Candida tropicalis</i>	drożdże	2.52
Cu ²⁺	<i>Cladosporium resinae</i>	grzyby	0.567
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	grzyby	0.504
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	drożdże	0.630

Tabela 2.2.2

Biomasa i biosorbenty oraz porównanie pojemności kationowymiennych [136]

Gatunek	Rodzaj biomasy	Pojemność biosorbenta [meq/g]
Żywice komercyjne		0,35-5,0
<i>Ascomyllum</i> sp.	brunatnica	2-2,5
<i>Eclonia radiata</i>	brunatnica	1,8-2,4
<i>Rhizopus arrhizus</i>	grzyb nitkowaty	1,1
<i>Sargassum</i> sp.	brunatnica	2-2,3
Torfowiec	mech torfowy	4,5-5,0
<i>Spirulina</i> sp.	mikroalga	2,0-11,4

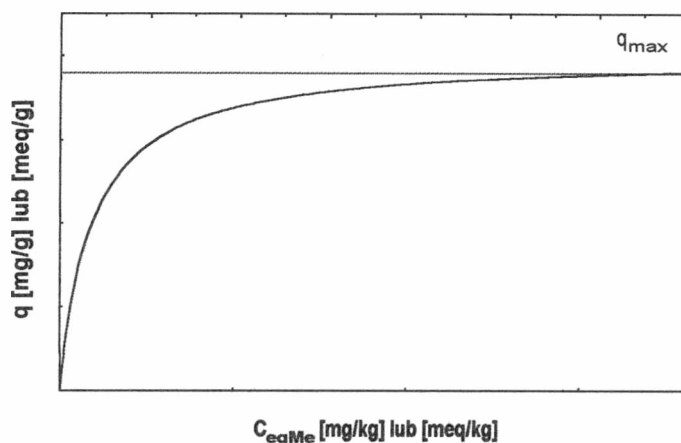
2.2.3 Czynniki wpływające na biosorpcję

Wydajność biosorpcji, najczęściej jest opisywana jako pojemność biosorpcyjna (q , mg metalu /g lub mmol/g biosorbenta) (Tabela 2.2.1). Wskaźnik q przyjmuje najczęściej wartości w zakresie kilku-kilkuset mg/g, w zależności od metalu i biomasy [157-159].

Czynniki wpływające na wiązanie jonów w procesie biosorpcji są następujące [42, 64, 65]:

- Stężenie jonu metalu w oczyszczanym ścieku: Stopień oczyszczenia ścieku (stężenie równowagowe jonów, C_{eqMe}) zależy od pojemności biosorpcyjnej wykorzystywanego szczepu (q), stężenia biosorbenta (X), oraz stężenia początkowego jonów metalu (C_{0Me}). Ze wzrostem

stężenia równowagowego metalu, wzrasta pojemność biosorpcyjna (q) (Rys. 2.2.1). Gdy zostanie osiągnięte *plateau*, powierzchnia sorbenta ulega wysyceniu (czyli przy wysokich początkowych stężeniach metalu) - osiągana jest wartość $q_{\max}$, określana mianem maksymalnej pojemności biosorpcyjnej, która zależy od liczby miejsc wiążących jony na powierzchni komórki.



Rys. 2.2.1

Przykładowa izoterma biosorpcji; q - pojemność biosorpcyjna, $q_{\max}$ - maksymalna pojemność biosorpcyjna, C_{eqMe} - stężenie równowagowe jonów metalu (przy danym stężeniu komórek)

- *Temperatura*: Przez wiele lat uważano, że biosorpcja, posiadająca naturę adsorpcyjną, jest procesem silnie zależnym od temperatury. Jednak, w świetle wstępnych badań, w zakresie temperatur 5-40 °C nie zaobserwowano wpływu temperatury na wydajność procesu [37].
- *pH*: Literatura nie dyskutuje szczegółowo wpływu pH na proces biosorpcji. Jako zalecenie podaje jedynie zakres przy którym nie istnieje niebezpieczeństwo destrukcji biomasy (3-9).

2.2.4 Mechanizm procesu biosorpcji

Przez wiele lat literatura przedmiotu postulowała adsorpcję jako dominujący mechanizm biosorpcji [19, 49, 86, 89, 91, 172]. Ostatnio okazało się jednak, że proces ten może mieć inną, bardziej kompleksową naturę, co więcej: zmieniającą się w zależności od gatunku organizmu, z wymianą jonową jako dominującym mechanizmem, postulowanym w ostatnich latach przez Profesora Bohumila Voleskiego (McGill University, Kanada) [141, 243-249, 273, 304].

Na biosorpcję składa się szereg procesów. Jon dyfunduje do powierzchni komórki mikroorganizmu, a następnie zostaje związany do miejsc na jej powierzchni. Na ten etap składa się szereg procesów: adsorpcja, wymiana jonowa, koordynacja, kompleksowanie, chelatowanie i mikrostrącanie. Proces ten jest szybki i odwracalny. Po biosorpcji mogą następować procesy dodatkowe, wolniejsze: wiązanie kowalencyjne, strącanie powierzchniowe, reakcje redoks [74, 76, 311, 62].

Jednoznaczne określenie mechanizmów rządzących biosorpcją jest utrudnione, ponieważ komórki nie mają ściśle zdefiniowanej formuły chemicznej, są strukturami o kompleksowej budowie. Ściana komórkowa jest zbudowana z biocząsteczek, takich jak peptydoglikan, kwasy teichowe i teichuronowe, lipoproteidy i polisacharydy, które są polielektrolitami. Na powierzchni ściany komórkowej znajdują się grupy funkcyjne, m.in. grupy karboksylowe, fosforylowe i aminowe, zdolne do wiązania kationów [52, 102, 259, 297, 308, 310].

- Opis ilościowy

Do opisu równowagi biosorpcji najczęściej wykorzystuje się izotermy Langmuira i Freundlicha, które często nie opisują zadowalająco wyników doświadczalnych. Natomiast przy założeniu, że mechanizm biosorpcji jest inny i jest nim np. wymiana jonowa, proces ten będzie można opisywać przy użyciu stałych równowagi poszczególnych miejsc wiążących na powierzchni komórki pomiędzy kationami a grupami funkcyjnymi. A zatem, sposób modelowania równowagi biosorpcji będzie zależny od natury procesu: inne zależności zostaną wykorzystane gdy rozpoznany mechanizm będzie adsorpcja, inne gdy np. wymiana jonowa czy wiązanie kowalencyjne.

Maksymalna pojemność sorpcyjna to maksymalna ilość metalu związanego przez jednostkę masy sorbenta, która tworzy kompletną monowarstwę na powierzchni, utworzoną przy wysokich C_{eq} . Reprezentuje praktyczną limitującą pojemność sorpcyjną, gdy powierzchnia jest w pełni pokryta jonami metalu. Jest wykorzystywana do porównania działania (wydajności) poszczególnych sorbentów, w przypadkach gdy sorbent nie osiągnął pełnego wysycenia w warunkach doświadczalnych.

Dane równowagowe, powszechnie znane jako izotermy sorpcji stanowią podstawę przy projektowaniu układów biosorpcyjnych. Zaproponowano klasyczne modele opisujące równowagę sorpcji (Langmuira, Freundlicha, Redlich-Petersona, kombinację Langmuira-Freundlicha (uogólnioną postać Freundlicha) i in. (Tabela 2.2.3) [208], które są wykorzystywane do opisu równowag pomiędzy związanymi jonami metalu na powierzchniach (w tym również na powierzchniach biologicznych w procesie biosorpcji)

($q_{eq}, q = \frac{(C_0 - C_{eq})V}{m}$) oraz jonami metalu w roztworze (C_{eq}) w danej temperaturze. Równanie

Langmuira (2.2.1) jest stosowane do opisu równowagi sorpcji monowarstwowej na powierzchni posiadającej określoną liczbę identycznych miejsc wiążących [3]. Maksymalna pojemność sorpcyjna zostaje osiągnięta gdy monowarstwa zostaje wysycona. Natomiast

empiryczne równanie Freundlicha (2.2.2), bazuje na równowadze sorpcji na powierzchniach, na których znajdują się miejsca wiążące o różnej charakterystyce [113].

Zarówno równanie Freundlicha, jak i Langmuira to modele 2-parametrowe. W przypadku, gdy żaden z tych modeli nie opisuje satysfakcjonująco danych, konieczne jest zastosowanie równania 3-parametrowego, np. Redlicha-Patersona (2.2.4), czy Langmuira-Freundlicha (2.2.3), które są kombinacją tych dwóch podstawowych modeli i w pewnych przypadkach sprowadzają się do modeli pojedynczych. Izoterma BET (2.2.5) reprezentuje wielowarstwową adsorpcję do miejsc heterogenicznych o różnym powinowactwie wiązania i zakłada, że izoterma Langmuira opisuje każdą z warstw [1]. Jest stosowana rzadko do opisu równowagi procesów biosorpcyjnych. Izotermy BET i Freundlicha są wykorzystywane przy niskich stężeniach sorbent/sorbat [6, 79, 169, 284, 285].

Tabela 2.2.3

Modele wykorzystywane do opisu wiązania jonów metali przez mikroorganizmy [43, 47, 56, 283, 310].

Izoterma	Równanie	Uwagi	
Langmuir	$q = \frac{bq_m C_{eq}}{1 + bC_{eq}}$	parametry są interpretowalne; model niestrukturalny; sorpcja monowarstwowa	(2.2.1)
Freundlich	$q = q_m C_{eq}^n$	proste wyrażenie; model niestrukturalny;	(2.2.2)
Langmuir- Freundlich	$q = \frac{bq_m C_{eq}^n}{1 + bC_{eq}^n}$	kombinacja powyższych modeli	(2.2.3)
Redlich-Peterson	$q = \frac{aC_{eq}}{1 + bC_{eq}^n}$	przybliżenie Freundlicha przy wyższych stężeniach;	(2.2.4)
Brunauer-Emmet-Teller (BET)	$q = \frac{BCQ^0}{(C_s - C)[1 + (B - 1)C / C_s]}$	sorpcja wielowarstwowa; występuje punkt przegięcia; brak odpowiednika „całkowitej pojemności“	(2.2.5)
Radke-Prausnitz	$\frac{1}{q} = \frac{1}{aC_{eq}} + \frac{1}{bC_{eq}^\beta}$	proste wyrażenie; równanie empiryczne, 3-parametrowe	(2.2.6)

Równanie Langmuira zostało wyprowadzone z równania szybkości sorpcji. Według założeń modelowych, sorbat zajmuje 1 miejsce, a równanie opisujące szybkość reakcji uwzględnia jednoczesne zachodzenie procesu adsorpcji i desorpcji, zgodnie z równaniem:

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{ad}(1 - \theta) - k_d\theta \quad (2.2.7)$$

gdzie θ oznacza stopień pokrycia powierzchni, czyli q/q_m . Gdy proces sorpcji osiąga stan równowagi ($\frac{d\theta}{dt} = 0$), równanie Langmuira będzie miało następującą postać:

$$q = \frac{bq_m C_{eq}}{1 + bC_{eq}} \quad (2.2.8)$$

gdzie b to stosunek stałych szybkości adsorpcji oraz desorpcji: $b=k_{ad}/k_d$.

Często żaden z przedstawionych modeli nie opisuje równowagi sorpcji jonów metalu przez mikroorganizmy, gdyż zostały one opracowane na potrzeby innych układów, np. adsorpcji gazów na powierzchniach, dlatego powinny być interpretowane z dużą ostrożnością przy stosowaniu dla tak kompleksowych układów jakimi są powierzchnie biologiczne. Volesky [286, 287] poddaje krytyce brak uniwersalności tych modeli: wyniki nie mogą być ekstrapolowane oraz nie można wyciągnąć prognoz dla układów pracujących w różnych warunkach. Dodatkowym problemem jest prowadzenie ciągłych krzywych izoterm przez punkty o dużym rozrzucie.

2.2.5 Odzysk związanego z biomasą metalu i regeneracja biomasy

Produktami procesu biosorpcji są oczyszczony ściek oraz jony metalu związane z biomasą, którą można wykorzystać w dwojaki sposób: poprzez spalanie (likwidacja) lub desorpcję (regeneracja) [281]:

- LIKWIDACJA – poprzez spalanie; biosorpcja służy tu jako narzędzie zmniejszenia objętości odpadu: duża objętość ścieku jest przekształcana do znacznie mniejszej objętości skoncentrowanego odpadu stałego. Proces ten umożliwia usunięcie jonów metalu, lecz powoduje powstanie toksycznego szlamu. Szlam po spaleniu daje popiół - koncentrat metalu, który może zostać wykorzystany jako surowiec w produkcji związków danego metalu.
- REGENERACJA – istnieje możliwość uniknięcia powstawania szlamu odpadowego i odzysku biosorbenta. Regeneracja stwarza możliwość odzysku nie tylko metalu wyekstrahowanego do fazy ciekłej ale również biomasy, która może zostać ponownie wykorzystana. W procesie desorpcji (podstawowe kryteria doboru desorbenta przedstawiono w Tabeli 2.2.4) jony metalu powinny zostać zatężone w stosunku do ścieku wyjściowego, nie prowadzi do zniszczenia biosorbenta (zmniejszenia pojemności biosorpcyjnej) [135-138]. Konsekwencją desorpcji jest powstanie zregenerowanego sorbenta oraz skoncentrowanego roztworu metalu o stężeniu ok. 10-100 razy wyższym od stężenia początkowego. Roztwór ten może zostać oczyszczony metodami klasycznymi, na przykład poprzez strącanie lub elektrolizę. Prowadzi zatem do odzysku metalu [140]. W zależności od rozpoznanego mechanizmu biosorpcji dobiera się rodzaj desorbenta. Desorpcja może opierać się na dwóch ogólnych zasadach, które mogą również działać w połączeniu: pewne rodzaje desorbentów, takie jak kwasy lub sole metalu dostarczają kationów, które konkurują o miejsca wiążące, a zatem wypierają je (tylko w przypadku gdy mechanizmem biosorpcji jest wymiana jonowa) [45]. Alternatywą jest zastosowanie ligandów (takich jak np. EDTA), które spowodowałyby kompleksowanie metalu w roztworze [140]. Wówczas stężenie niezwiązanych jonów w

roztworze ulega obniżeniu. W takim przypadku, metal jest wprowadzany do roztworu, a zatem biosorpcja ulega odwróceniu [90, 317].

Tabela 2.2.4
Kryteria wyboru desorbenta jonów metali z biomasy [4, 91, 140, 275]

rodzaj desorbenta zależy od mechanizmu biosorpcji	szybka kinetyka
niski stosunek objętości eluent/regenerowany sorbent	selektywność w stosunku do jonu metalu
wysoki współczynnik koncentracji (po desorpcji i przed adsorpcją)	brak strukturalnego zniszczenia sorbenta- utrzymanie
wysoka wydajność desorpcji (min. 95 % metalu	wysokiej zdolności wiązania metalu w kolejnym cyklu
powinno ulec desorpcji)	niski koszt
	nieszkodliwość dla środowiska

Niektóre z tych kryteriów są sprzeczne: jeżeli stosowana jest mniejsza objętość eluenta, w celu osiągnięcia wysokiego współczynnika koncentracji, wydajność może ulec obniżeniu. Desorpcja może zostać przeprowadzona zarówno przez kwasy (HCl, H₂SO₄), jak i roztwory soli (np. CaCl₂). W każdym przypadku, kation (H⁺ lub Ca²⁺) konkuruje z jonem metalu o miejsce wiążące, oraz prowadzi do wymiany jonowej, w przypadku gdy stężenie desorbenta jest wystarczająco wysokie [102, 297]. Uważa się, że kwasy mineralne o stężeniu ok. 0.1 mol/dm³ są wydajnymi i tanimi desorbentami. Chociaż wysokie stężenia eluenta prowadzi do wysokiej wydajności, skrajne wartości pH mogą powodować zniszczenie struktury materiału biologicznego.

2.2.6 Mikroalgi - biosorbenty posiadające wiele zalet

Przy doborze szczepu - biosorbenta, należy się kierować zależnością pojemności biosorpcyjnej od stężenia równowagowego jonów metalu oraz warunkami namnażania biomasy i elastycznością metabolizmu. Szczep nie powinien być toksyczny ani wytworzony w sposób sztuczny (np. metodami inżynierii genetycznej).

Kryterium takie spełnia *Spirulina sp.* - organizm miksotroficzny, o wysokiej $q_{\max}$. Mikroalgi wykorzystują światło jako źródło energii, dlatego możliwe jest podtrzymanie metabolizmu w przypadku braku dostępu do organicznego źródła węgla. Dodatkowo, mogą być hodowane w otwartych zbiornikach. Przenoszenie skali z laboratoryjnej na przemysłową również nie sprawia trudności [31, 32, 39, 40, 49, 68, 70, 167, 173, 231, 252, 267].

W literaturze przedstawia się mikroalgi jako mikroorganizmy umożliwiające sorbowanie jonów metali z roztworów rozcieńczonych i dodatkowo, akumulowanie ich w strukturze komórki [57, 64, 65, 67, 68]. Proces biosorpcji u alg przebiega głównie na powierzchni ściany komórkowej, która zbudowana jest z włóknistego szkieletu i amorficznej matrycy otaczającej. Najczęściej spotykanym materiałem włóknistym jest celuloza, ale może być zastępowana mannanem lub ksylanem. Występują tu również kompleksowe heteropolisacharydy, oraz peptydoglikany [226].

2.2.7 Urządzenia do biosorpcji

Ponieważ biosorpcja jest procesem szybkim [304-307] (równowaga zostaje osiągnięta w ciągu kilku minut), nie ma szczególnych wymagań w stosunku do biosorberów, które mogą być niewielkich rozmiarów. W biosorpcji przemysłowej stosowane są reaktory kolumnowe z wypełnieniem [134, 139], reaktory ze złożem fluidalnym [169, 281] lub proste aparaty mieszalnikowe [81-83, 169, 222].

2.3 Bioakumulacja

Mikroorganizmy są w stanie zatęczać metale w sposób pasywny i aktywny metabolicznie. Czynniki fizykochemiczne - światło, pH, temperatura, mają wpływ na wiązanie jonów metali ciężkich przez algi. Istnieje ścisły związek pomiędzy wewnątrzkomórkowym stężeniem jonów metalu, a szybkością wzrostu, ponieważ zmiany tych wskaźników wpływają na siebie nawzajem [126].

2.3.1 Podstawy procesu bioakumulacji

Podczas gdy ukazało się wiele prac dotyczących usuwania jonów w procesie biosorpcji oraz istnieją przykłady praktycznego zastosowania procesu [51, 59], niewiele uwagi poświęcono bioakumulacji przez żywe komórki. Deficyt informacji w tej dziedzinie (w szczególności w zakresie mechanizmu procesu, praw nim rządzących, opisów ilościowych oraz rozwiązań procesowych) oraz szereg problemów do tej pory nie rozwiązanych ograniczają przemysłowe zastosowanie tej techniki [215].

Bioakumulacja jest definiowana jako transport zanieczyszczeń (organicznych lub nieorganicznych) do wnętrza komórek organizmów żywych [12, 258]. Kompleksowość procesu powoduje, że jest zagadnieniem interdyscyplinarnym [233] z pogranicza mikrobiologii, chemii oraz inżynierii bioprosesowej. Prace nad bioakumulacją wymagają określenia m.in. mechanizmu (wiązanie do ściany komórkowej oraz wprowadzanie jonów do wnętrza komórki i depozycja w organellach subkomórkowych), określenia warunków namnażania biomasy (parametry hodowli, inżynieria fotobioreaktorów) oraz wpływu obecności zanieczyszczeń na parametry kinetyczne wzrostu [75, 76].

Bioakumulacja może znaleźć zastosowanie tylko w oczyszczaniu ścieków o niskim stopniu zanieczyszczenia (poniżej poziomu toksycznego dla komórki), zawierających jednocześnie składniki pokarmowe (azotany, fosforany, siarczany oraz organiczne lub nieorganiczne źródło węgla) [89]. Przykładowo, sztuczne stawy zawierające mikroorganizmy fotosyntetyczne mogą być wykorzystywane do oczyszczania odcieków z kopalni podczas zakwitów, dzięki znajdujących się w nich składnikom pokarmowym [76]. Wyprodukowana

biomasa może zostać również wykorzystana jako biosorbent. Kolejnym przykładem zastosowania bioakumulacji są klasyczne biologiczne oczyszczalnie pracujące na osadzie czynnym [89, 300].

2.3.2 Bioakumulanty

Bioakumulanty to organizmy żywe, które akumulują jony metali ciężkich w strukturze komórki [12]. Do grupy tej zaliczanych jest bardzo wiele gatunków mikroorganizmów, grzybów, roślin, zwierząt. W Tabeli 2.3.1 zestawiono przykładowe mikroorganizmy uznawane za bioakumulanty oraz ilość metalu, która może zostać przez nie zakumulowana (pojemność bioakumulacyjna). O przydatności bioakumulanta decyduje nie tylko ilość wiążanego jonu metalu, ale przede wszystkim toksyczność komórkowa, szybkość namnażania oraz szybkość wiązania jonów metali, jak również wymagania pokarmowe i warunki hodowli. Pojemność bioakumulacyjna zależy od gatunku organizmu oraz jonu metalu. Zaobserwowano odwrotnie proporcjonalną zależność wielkości organizmu i pojemności bioakumulacyjnej [12], ponieważ organizmy wyższe wykształciły bardziej kompleksowe mechanizmy obronne przed wprowadzeniem jonów metalu do ustroju. W związku z tym mikroorganizmy, zaliczane do organizmów o najniższym stopniu organizacji, powinny być najlepszymi bioakumulantami [176, 178].

Tabela 2.3.1
Maksymalna akumulacja metali ciężkich przez mikroorganizmy [89]

Organizm	Metal	Akumulacja [% s.m.]	Organizm	Metal	Akumulacja [% s.m.]
<i>Citrobacter sp.</i>	Pb	34-40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cd	0,24-3,12
	Cd	13,5		Zn	0,45
<i>Zooglea sp.</i>	Co	25	<i>Rhizopus arrhizus</i>	Cu	1,6
	Cu	34		Cd	3,0
	Ni	13		Pb	10,4
<i>Bacillus cereus</i>	Cd	3,9-8,9	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Cd	0,3
<i>Escherichia coli</i>	Cd	0,16-0,98	<i>Chlorella vulgaris</i>	Au	10
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Ag	25			

2.3.3 Czynniki wpływające na bioakumulację

Proces bioakumulacji polega na oddziaływaniu żywych komórek mikroorganizmów z jonami metalu, zatem czynniki wpływające na kinetykę oraz efektywność bioakumulacji będą związane ze stanem fizjologicznym komórek, ich stężeniem oraz formą jonów metalu w roztworze (Tabela 2.3.2) [84, 112, 301], czyli składem roztworu, tj. stężeniem usuwanych jonów, zawartością tlenu i dwutlenku węgla, siłą jonową, pH oraz dostępnością substancji zawierających azot i fosfor, a spełniających rolę pożywki. Przebieg procesu usuwania metali zależy również od temperatury oraz w przypadku mikroalg, dostępu światła [213], które mają decydujący wpływ na rozwój mikroorganizmów fotosyntetycznych.

Tabela 2.3.2
Czynniki wpływające na bioakumulację

czynniki wewnątrzkomórkowe	czynniki zewnątrzkomórkowe
cechy szczepu (m.in. specyficzna szybkość wzrostu), stan fizjologiczny komórki (np. wiek), faza wzrostu, obecność metabolitów zewnątrzkomórkowych	cechy jonu (m.in. poziom toksyczności dla komórki), stężenie, siła jonowa, potencjał redoks, pH, temperatura, skład pożywki, czas kontaktu

2.3.4 Mechanizm procesu bioakumulacji

Mechanizm wiązania jonów metali oraz efekt toksyczny jaki wywołują w komórce różni się w zależności od szczepu mikroorganizmu oraz jonu metalu (przykładowo dla *E. coli* przedstawiono w Tabeli 2.3.3). Często zdarza się, że jon stanowiący niezbędny składnik dla wzrostu jednego organizmu, będzie całkowicie niepożądany i toksyczny dla innego, gdyż podłoże działania toksycznego leży w płaszczyźnie specyficznych oddziaływań molekularnych jonów metalu z biocząsteczkami.

Tabela 2.3.3
Toksyczność wybranych jonów metali ciężkich

Jon metalu	Stężenie Hamujące Wzrost u <i>E. coli</i> [194] [mmol/dm ³]	Ogólny opis działania toksycznego
Cd ²⁺	> 0,5	Kadm ma tendencję do wiązania się do grup tiolowych i tym samym denaturacji białka, interferuje z metabolizmem wapnia, niszczy błony komórkowe [194]. Ze względu na niski potencjał Cu ²⁺ /Cu ⁺ (-268 mV) w warunkach fizjologicznych miedź tworzy kompleksy z wolnymi rodnikami, np. z tlenem atomowym. Toksyczność miedzi wiąże się produkcją rodników nadtlenkowych [93]. Przejścia pomiędzy Cr(VI) i Cr(III) są możliwe w warunkach fizjologicznych. Cr(VI) jest bardziej toksyczny od Cr(III). U człowieka Cr(III) wiąże się do niskocząsteczkowego peptydu, który aktywuje specyficznie receptor insulinowy kinazy tyrozynowej [61]. Nadmiar Cr(III) jest równie niebezpieczny jak niedobór. Wyjaśnia to, dlaczego niedobór chromu powoduje zmniejszenie tolerancji na glukozę i objawy podobne do cukrzycy. U mikroorganizmów natomiast nie zaobserwowano pozytywnej roli jaką może odegrać chrom [100].
Cu ²⁺	> 1,0	
Cr ³⁺	> 5,0	

Przy rozważaniu mechanizmu procesu bioakumulacji konieczne jest wprowadzenie dodatkowej nomenklatury. Pierwszym etapem procesu jest wiązanie jonów do powierzchni komórki. Mechanizm tej fazy jest identyczny z biosorpcją, a w niniejszej pracy będzie określany terminem etapu **pasywnego** bioakumulacji, ponieważ nie obserwuje się tu aktywności metabolicznej komórek. W dalszej kolejności jony metalu są wprowadzane do wnętrza komórki (bioakumulacja właściwa). Proces ten wymaga nakładów energetycznych, czyli aktywności metabolicznej komórki, dlatego w niniejszej pracy będzie określany jako etap **aktywny** bioakumulacji. Bioakumulacja jest zatem kombinacją procesu pasywnego i aktywnego, jest procesem konsumującym energię komórkową - m.in. na transport jonów metalu do wnętrza komórki oraz na namnażanie biomasy. Konsekwencją tego jest ograniczona szybkość, znacznie niższa niż w procesie biosorpcji.

Mechanizm procesu bioakumulacji jest następujący [212]:

- 1 Etap pasywny - wiązanie metalu na zewnętrznej powierzchni komórki - proces biosorpcji. Gdy jon metalu wejdzie w kontakt z powierzchnią mikroorganizmu, zostaje związany w miejscach na powierzchni komórki o wysokim powinowactwie do danego jonu [150]. Proces sorpcji jonu na powierzchni zachodzi szybko, czyli nie limituje kinetyki bioakumulacji.
- 2 Etap aktywny I - wprowadzanie jonu do wnętrza komórki - etap ten zachodzi tylko u żywych komórek i wymaga transportu aktywnego (wymagającego nakładów energetycznych) lub kontrolowanego dyfuzją transportu przez barierę energetyczną jaką stanowi błona komórkowa (nie wymagający nakładów energetycznych). Taki szlak istnieje zarówno dla metali niezbędnych komórce (np. cynk) jak i metali toksycznych, wprowadzanych do wnętrza komórki omyłkowo (np. kadm). Jest hamowany przez: niską temperaturę, inhibitory metabolizmu, brak źródła energii [88, 89]. Na szybkość akumulacji metalu ma wpływ stan metaboliczny komórek oraz skład pożywki. Systemy transportujące posiadają różną specyficzność względem jonu metalu, a więc komórki pobierają zarówno jony im potrzebne jak i toksyczne. Większość mechanizmów transportu opiera się na elektrochemicznym gradiencie protonów w poprzek błony komórkowej, którego składowe to gradient pH oraz elektryczny z których każdy może napędzać transport obdarzonych ładunkiem substancji rozpuszczonych przez błonę komórkową. To właśnie potencjał błonowy jest odpowiedzialny za transport kationów. W niektórych przypadkach mechanizmem transportu jonu metalu do wnętrza komórki może być dyfuzja, szczególnie gdy jego toksyczność prowadzi do zmian w przepuszczalności błony komórkowej [261]. Równocześnie następuje namnażanie biomasy [66].
- 3 Etap aktywny II - wewnątrzkomórkowa lokalizacja i depozycja - jon metalu zostaje związany przez białka bądź inne makrocząsteczki tam się znajdujące lub zamknięty w strukturach subkomórkowych - immobilizacja poprzez tworzenie nierozpuszczalnych struktur organo-metalicznych, takich jak metalotioneina, fitochelatyny (u mikroalg) [67] lub białka zawierające metale. Może być również deponowany w organellach komórkowych. Na tym etapie komórka zostaje zabezpieczona przed toksycznym działaniem metalu. Po wprowadzeniu do wnętrza komórki, jony mogą ulegać kompartmentacji lub są unieszkodliwiane poprzez wiązanie (białka) i precipitację [89].

Komórki mikroorganizmów wykształciły pewne mechanizmy chroniące je przed toksycznym wpływem jonów metali ciężkich poprzez:

- 1 Zewnątrzkomórkowe wiązanie i strącanie - niektóre mikroorganizmy mogą syntezować polimery znajdujące się na powierzchni błony komórkowej. Polimery te mogą wiązać jony z roztworu.
- 2 Nieprzepuszczalność i ochrona - metal nie wchodzi do wnętrza komórki, a więc nie ma efektu toksycznego.
- 3 Wewnątrzkomórkowa detoksyfikacja - depozycja w organellach (mitochondria, wakuole, jądro komórkowe, chloroplasty, ciała polifosforanowe i ściana komórkowa).

Opis ilościowy

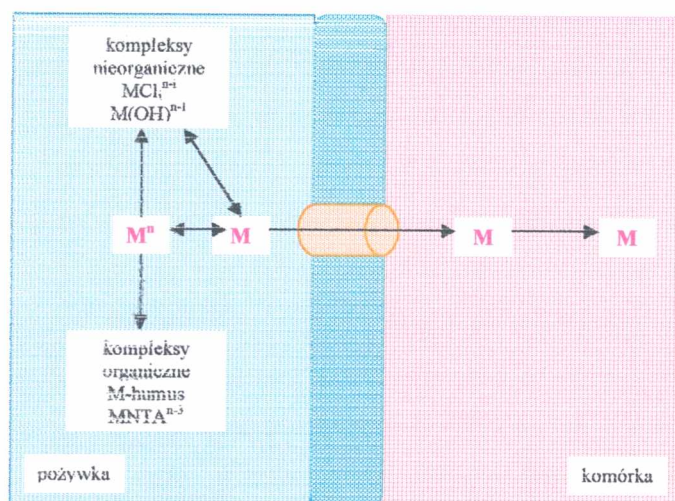
Modele biosorpcyjne mogą zostać wykorzystane tylko do opisu pasywnego etapu bioakumulacji. Należy również uwzględnić charakterystyczne cechy procesu, w szczególności generację nowej powierzchni sorpcyjnej oraz istnienie transportu aktywnego jonu metalu przez błonę komórkową do cytoplazmy [127]. W literaturze niewiele uwagi poświęca się modelowaniu tego procesu.

Chemiczna specjacja ma decydujący wpływ na wprowadzanie jonów metalu do wnętrza komórki. Błona komórkowa jest praktycznie nieprzepuszczalna dla form obdarzonych ładunkiem lub polarnych. Jony metalu są zazwyczaj transportowane przy wykorzystaniu wyspecjalizowanych nośnikowych białek błonowych [260]. Przedstawiono schemat (Rys. 2.3.1) zależności pomiędzy specjacją jonów metalu na zewnątrz oraz transportem metalu (M) do wnętrza komórki przez białko transportujące. Akumulacja we wnętrzu jest związana z ilością metalu związanego z białkiem transportującym, które jest z kolei kontrolowane przez

stężenia wolnych jonów metalu (M^{n+}) w przypadku termodynamicznej kontroli transportu lub stężenia nieorganicznych form metalu (wolne jony lub kompleksy nieorganiczne) w kontroli kinetycznej. Kompleksy organiczne nie dysocjują wystarczająco szybko by bezpośrednio dostarczać metal do białka transportującego. Kompleksowanie organiczne wywiera większy wpływ na szybkość akumulacji metalu poprzez kontrolę zewnętrznego stężenia wolnych jonów metalu i kompleksów nieorganicznych [260].

Jony metalu wiążą się do miejsc receptorowych na białkach nośnikowych, a następnie dysocjują z powrotem do pożywki lub są transportowane w poprzek błony i uwalniane do cytoplazmy. Szybkość wewnątrzkomórkowej akumulacji metalu opisano równaniami (2.3.1-2.3.3) [89].

$$r = \frac{r_{\max} [Me^z] K_M}{[Me^z] K_M + 1} \quad (2.3.1) \quad r_{\max} = k_2 [N] \quad (2.3.2) \quad K_M = \frac{k_1}{k_2 + k_3} \quad (2.3.3)$$



Rys. 2.3.1

Wprowadzanie jonów metalu do wnętrza komórki w procesie bioakumulacji

Metale toksyczne są pobierane przez komórki systemem transportu składników pokarmowych, wypierają je z ich miejsc metabolicznych stając się toksyczne dla komórki [260]. Niezbędna do zrozumienia regulacji komórkowej tych systemów transportowych jest znajomość czynników kontrolujących akumulację zarówno metali toksycznych jak i potrzebnych. Komórki regulują szybkość akumulacji składników pokarmowych aby podtrzymać ich wewnątrzkomórkowe stężenie na poziomie optymalnym dla wzrostu i metabolizmu.

Zależności pomiędzy szybkością akumulacji metalu, szybkością wzrostu oraz komórkowym stężeniem metalu. Podczas fazy wzrostu logarytmicznego, stężenie zewnętrzne jonów metalu, szybkość akumulacji metalu przez komórki, stężenie metalu w komórce oraz specyficzna szybkość wzrostu są ze sobą związane [260]

W zaproponowanym modelu szybkość bioakumulacji (r) opisano jako iloczyn komórkowego stężenia metalu (q) i specyficznej szybkości wzrostu (μ) (2.3.4). Założono, że proces ten zachodzi zgodnie z kinetyką pierwszorzędową (2.3.5) oraz, że pojemność bioakumulacyjna jest proporcjonalna do specyficznej szybkości wzrostu (2.3.6). W rezultacie, zależność pojemności bioakumulacyjnej od stężenia jonów metalu w roztworze opisano równaniem 2.3.7) [126].

$$r = q \cdot \mu \quad (2.3.4) \quad r = k[Me^z] \quad (2.3.5) \quad \mu = Bq \quad (2.3.6) \quad q = \sqrt{\frac{k[Me^z]}{B}} \quad (2.3.7)$$

Model Ting'a, Lawson'a i Prince'a [215, 266, 267, 268] zakłada 2 etapy procesu: 1) wstępne, szybkie wiązanie jonu do ściany komórkowej, 2) wolniejszy transport przez błonę komórkową. Działanie tego modelu potwierdzono dla jednokomórkowych alg: *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella vulgaris* i *Chlamydomonas reinhardtii*.

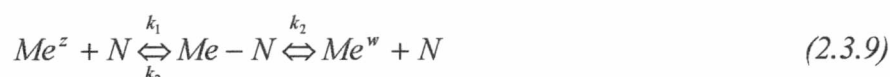
Założenia modelowe:

1. Stężenie jonu metalu w roztworze przy powierzchni komórki ($[Me^z]$, [mmol/dm³]) jest w równowadze z metalem zaadsorbowanym na jej powierzchni, (q^z [mmol/mg]). Pomiędzy tymi wartościami zakłada się zależność liniową dla niskich stężeń metalu:

$$q^z = a \cdot [Me^z] \quad (2.3.8)$$

W tym przypadku można też zastosować izotermy: Freundlicha czy Langmuira, jednak dla roztworów rozcieńczonych prawdziwa jest zależność liniowa.

2. Jon metalu zaadsorbowany na powierzchni komórki jest transportowany przez błonę komórkową przy udziale cząsteczek nośnikowych.



Transport kompleksu metal-nośnik $Me-N$ przez błonę komórkową jest procesem szybkim, a stężenie N i $Me-N$ są niskie w porównaniu do $[Me^z]$ i $[Me^w]$.

3. Bilans jonów metalu w układzie:

$$[Me^T] = ([q^z] + [q^w]) \cdot X + [Me^z] \quad (2.3.10)$$

Na podstawie powyższych założeń zaproponowano następujący model:

$$r = \frac{d(Xq^w)}{dt} = X \cdot k_2 \left\{ q^z - \frac{k_3}{k_1} q^w \right\} \quad (2.3.11)$$

$\frac{d(X[q^w])}{dt}$ - szybkość transportu do wnętrza komórki

Model staje się kompletny po uwzględnieniu stężenia komórek w funkcji czasu. Rozpatrywane są trzy przypadki: 1) akumulacja metalu przez komórki żywe bez wzrostu

(2.3.12), 2) akumulacja przez komórki w fazie liniowego wzrostu (2.3.13), 3) akumulacja przez komórki w fazie wzrostu logarytmicznego (2.3.14).

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad \text{brak wzrostu} \quad (2.3.12) \quad \frac{dx}{dt} = L \quad \text{wzrost liniowy} \quad (2.3.13) \quad \frac{dx}{dt} = \mu x \quad \text{wzrost logarytmiczny} \quad (2.3.14)$$

Rozwiązanie numeryczne można uzyskać przez rozwiązanie równania różniczkowego I-rzędu (2.3.11) w układzie z odpowiednim równaniem wzrostu [215].

Odzysk związanego metalu

W przypadku bioakumulacji nie istnieje możliwość jednoczesnego odzysku metalu znajdującego się wewnątrz komórki i regeneracji biomasy. Komórki można jednak spalić i uzyskać popiół będący koncentratem metalu. Biomase zawierającą wewnątrz komórki jony metali można jednak wykorzystać w procesie biosorpcji, w każdym cyklu regenerując jej powierzchnię.

2.3.5 Mikroalgi jako bioakumulanty

Idea wykorzystania mikroalg do bioakumulacji jonów metali ciężkich została po raz pierwszy zaproponowana przez Oswald'a i Gootas'a w 1957 r. [206], ale problematyka ta zyskała zainteresowanie dopiero w latach 90-tych [207]. Systemy oczyszczania ścieków wykorzystujące żywe mikroalgi mogą jednocześnie efektywnie eliminować odpowiedzialne za eutrofizację związki azotu i fosforu [92, 296]. Podczas bioakumulacji stężenie metalu może zostać obniżone do poziomu niższego niż w przypadku biosorpcji [280], jednak wymagany czas jest dłuższy [162, 301].

Badania wykazały, że mikroalgi są bardziej wydajne w wiązaniu jonów metali ciężkich niż bakterie czy grzyby [126]. Bioakumulacja jonów metali przez żywe algi związana jest z aktywnością metaboliczną i fotosyntezą [112, 124-127]. Posiadają wysoką tolerancję na obecność jonów metali ciężkich. W obecności jonów metali ciężkich następuje nadekspresja specyficznych peptydów i białek wiążących metale (m.in. fitochelatyny) [280, 301], co wynika z adaptacji fizjologicznej [41, 175], gdyż organizmy te często bytują w siedliskach o wysokim stopniu zasolenia.

Bioakumulacja, jako metoda oczyszczania ścieków nie znalazła do tej pory praktycznego zastosowania na szeroką skalę, gdyż jest procesem słabo zbadanym, nie usystematyzowanym. Występuje tu szereg problemów do tej pory nie rozwiązanych. Informacje literaturowe dotyczące bioakumulacji są skąpe, a znalezienie danych na temat zdolności bioakumulacyjnych poszczególnych szczepów jest praktycznie niemożliwe. W literaturze znaleziono nieprecyzyjne, półilościowe informacje dotyczące bioakumulacji jonów

metali ciężkich przez rosnące komórki *Spirulina sp.*, nie obejmujące próby wyjaśnienia mechanizmu procesu, ani opisu kinetycznego (Tabela 2.3.4).

Tabela 2.3.4
Wpływ jonów metali ciężkich na wzrost *Spirulina* [112]

Metal	stężenie nie hamujące wzrostu [mg/kg]	stężenie zmniejszające wzrost o 1/3 [mg/kg]	stężenie zmniejszające wzrost o 2/3 [mg/kg]	stężenie całkowicie hamujące wzrost [mg/kg]	% usuniętego metalu $C_{0Me}=1$ mg/kg	współczynnik zateżenia* $C_{0Me}=1$ mg/kg
Hg	brak danych	0,25	0,5	1,0	36	1228
Cd	brak danych	5,7	22,8	45,6	77	2096
Pb	10,4	-	-	104	24	1305

* współczynnik zateżenia = (metal związany z biomasą mg Me/g s.m.)/(metal w roztworze mg Me/dm³)

Większość prac poświęconych bioakumulacji jonów metali ciężkich przez mikroalgi (podobnie jak większość prac poświęconych bioakumulacji) dotyczy końcowego stężenia metalu. Bardzo niewiele uwagi natomiast poświęcono ilościowemu opisowi kinetycznemu oraz rozpoznaniu mechanizmu. Większość publikacji jedynie relacjonuje ilość metalu związanego z biomasą bez podawania danych ilościowych i obejmuje najczęściej następujące szczepy mikroalg: *Chlorella vulgaris* [10], *Chlamydomonas reinhardtii* [128] jako algi modelowe [59]. Są to jednak badania raczej jakościowe niż ilościowe [126]. Przykładowo, maksymalne stężenie Cr³⁺ tolerowane przez mikroalgę *Scenedesmus acutus* to 15 mg/dm³, a *Chlorella vulgaris* 45 mg/dm³ [272].

W przypadku mikroalg, dodatkowym czynnikiem fizykochemicznym wpływającym na bioakumulację jest natężenie światła [94]. Stwierdzono, że bioakumulacja jonów Cr³⁺ oraz ich toksyczność u mikroalgi *Scenedesmus acutus* jest procesem zależnym od natężenia światła. Im wyższe jego natężenie, tym toksyczność chromu jest niższa a bioakumulacja wyższa, co z kolei sugeruje, że bioakumulacja zależy od ilości dostępnej energii [94, 301].

2.3.6 Urządzenia do bioakumulacji

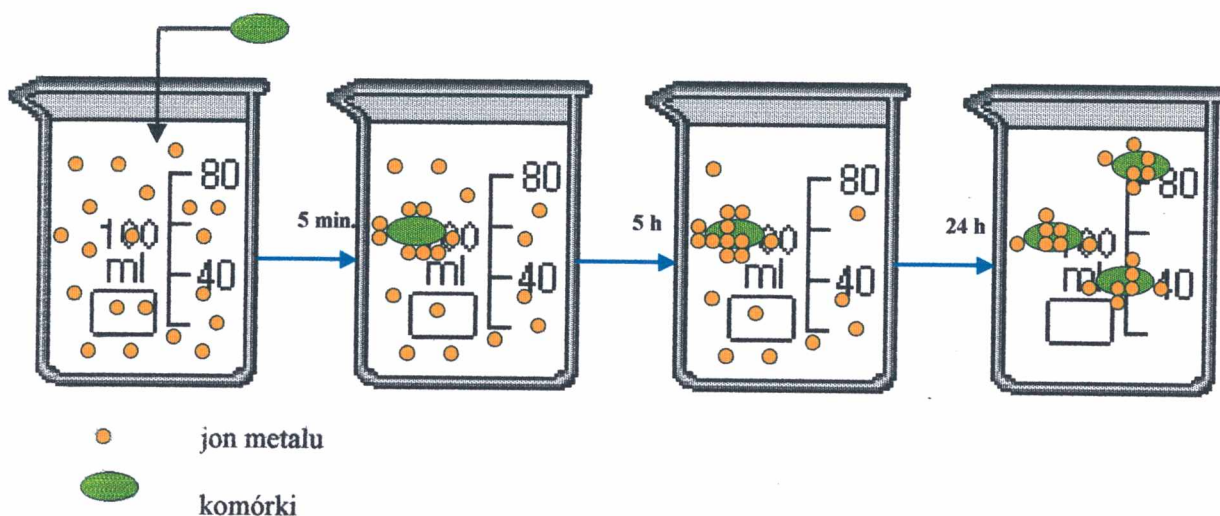
Proces bioakumulacji to hodowla komórek w obecności jonów metali ciężkich. Powinna zatem być prowadzona w reaktorze do namnażania biomasy (w przypadku mikroalg w fotobioreaktorze).

2.4 Porównanie biosorpcji i bioakumulacji

Etap pasywny (biosorpcja) jest pierwszą, najszybszą fazą bioakumulacji (trwa kilka minut), podczas którego następuje wiązanie jonu metalu do miejsc wiążących znajdujących się na powierzchni biomasy (Rys. 2.4.1). Następny etap (aktywny), przeprowadzany jedynie przez żyjące komórki trwa kilka godzin i polega na wprowadzaniu jonów metalu, związanych z grupami funkcyjnymi, do wnętrza oraz wiązaniu jonów z roztworu do zwolnionych w ten

sposób miejsc wiążących. Następnie biomasa ulega namnożeniu, następuje zwiększenie powierzchni wiążącej jony oraz zwiększenie dostępnego dla jonów wnętrza komórek.

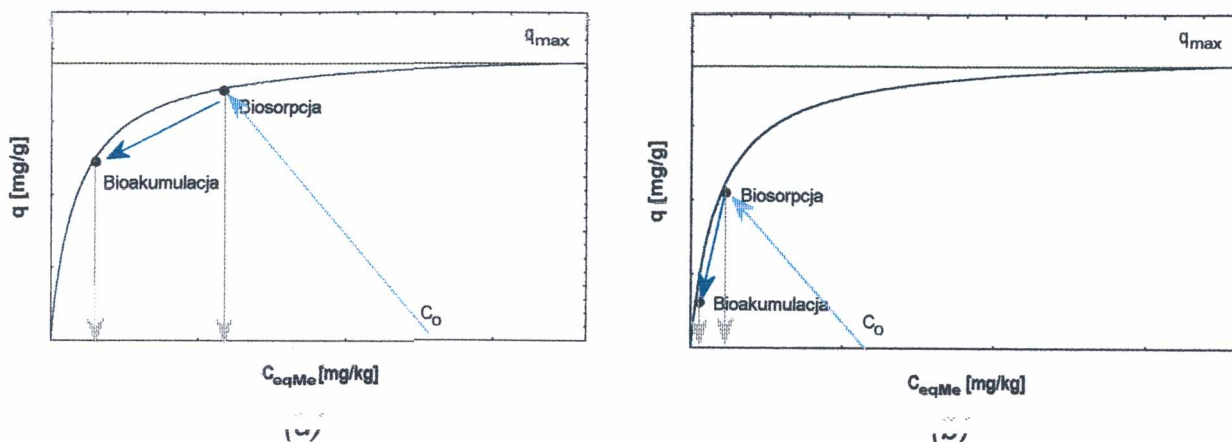
W literaturze podaje się, że ok. 90 % metalu związanego przez biomasę zostaje usunięte na drodze pasywnej w ciągu pierwszych 5-40 minut procesu, a jedynie 10 % jest wiązanych na drodze bioakumulacji (w ciągu godzin lub dni) [112]. W hodowli mikroalg, na etapy usuwania metali zarówno niezależne jak i zależne od metabolizmu ma wpływ zmiana warunków wzrostu (np. pH lub wydzielanie związków, które zachowują się jak chelaty metali) [89].



Rys. 2.4.1

Bioakumulacja jonów metali ciężkich przez mikroorganizmy. Proces składa się z dwóch etapów: 1-biosorpcja (etap pasywny), 2-bioakumulacja (etap aktywny)

Jeżeli przebiega tylko etap pasywny (biosorpcja) wówczas ustala się stan równowagi $q^z \Leftrightarrow C_{eq}$ (Rys. 2.4.2). W momencie rozpoczęcia etapu aktywnego następuje wprowadzanie jonów do wnętrza komórki, czyli zmniejszenie pojemności wiązania jonów przez powierzchnię komórki (q^z), a zwiększanie pojemności akumulowania jonów metalu w jej wnętrzu (q^w). Dodatkowo, q^z ulega zmniejszeniu na skutek namnażania biomasy. Zmniejszenie q^z powoduje przesunięcie stanu równowagi w kierunku mniejszych wartości C_{eq} . Dzięki temu stopień oczyszczenia ścieków w procesie bioakumulacji jest większy niż w biosorpcji, szczególnie jeśli $q^z \ll q_m^z$ (Rys. 2.4.2b).



Porównanie równowagi w kierunku mniejszych wartości C_{eq} w procesie bioakumulacji w porównaniu do biosorpcji.

Najpoważniejszym ograniczeniem bioakumulacji jest, że ścieki stanowią jednocześnie pożywkę wzrostową, a więc powinny dostarczać mikroorganizmom składniki pokarmowe, potrzebne do wzrostu [5, 91] - powinny spełniać kryteria pożywki minimalnej. Poważną wadą jest też mała szybkość procesu, związana z koniecznością budowania olbrzymich instalacji do bioakumulacji ciągłej, które umożliwią uzyskanie odpowiednio wysokich czasów przebywania. Kolejną niedogodnością jest możliwość wywołania efektu toksycznego przez jony metalu. Do zalet bioakumulacji można natomiast zaliczyć, możliwość obniżenia stężenia zanieczyszczeń do bardzo niskich poziomów, głównie dzięki kompleksowej naturze, na który składa się wiele procesów [89] oraz symultanicznego usuwania również innych zanieczyszczeń - m.in. związków azotu i fosforu (Tabela 2.4.1)

Tabela 2.4.1
Problemy związane z procesem bioakumulacji [112].

Systemy oczyszczania są limitowane toksycznością metalu.	Zagrożenie wtórnym zanieczyszczeniem ścieków - np. nie skonsumowanymi składnikami pokarmowymi
Zapotrzebowanie na pożywkę i składniki pokarmowe.	Zmiana w aktywności i stabilności populacji mikrobiologicznej w różnych warunkach: pH,
Związany metal może być usunięty z biomasy jedynie metodami destrukcyjnymi, a sama biomasa nie może być wykorzystana ponownie.	obecność składników pokarmowych, warunki hydrauliczne
Bardziej skomplikowana kontrola procesu	

Ponieważ w procesie bioakumulacji następuje symultaniczne namnażanie bioakumulanta [69, 261], wykorzystanie rosnących hodowli do biουςuwania eliminuje potrzebę stosowania oddzielnego węzła namnażania biomasy (hodowla, zbieranie, suszenie, procesowanie oraz magazynowanie) [69, 230].

3. MIKROALGI *Spirulina*

3.1 Charakterystyka ogólna

Mimo, że pierwszy zapisany przekaz dotyczący alg pojawił się w starożytnych Chinach, nowoczesne badania naukowe w tej dziedzinie rozpoczęły się dopiero w XIX w. i zostały zapoczątkowane przez Vaucherera, Agardha, Lyngbye'a i in. - wówczas powstała nauka zwana współcześnie *Fykologią* lub *Algologią*, traktowana jako jedna z dziedzin nauk przyrodniczych [132]. Fykologia początkowo zajmowała się głównie opisywaniem nowych gatunków glonów, później także ich biologią, ekologią, florą, znaczeniem gospodarczym oraz tworzeniem taksonomicznych systemów, a ostatnio również rolą w ekosystemach i fizjologicznym badaniem kultur glonów [198].

Algi (lub inaczej: glony) [116] stanowią 30-40 % całkowitej biomasy roślinnej. Są postrzegane jako najbardziej szeroka grupa pod względem rozmiaru komórki, formy i funkcji ekologicznej. Mają różny kształt, poczynając od małych, pojedynczych komórek, posiadających ok. 3 μm średnicy (mikroalgi - *Chlorella vulgaris*), kończąc na rozgałęzionych, wielokomórkowych formach (niektóre makroalgi mają długość sięgającą 50 m - brunatnica *Macrocystis pyrifera*) [254]. Aż trudno uwierzyć, że obydwa gatunki zaliczane są do tej samej kategorii - alg.

Terminem *mikroalgi* określane są fotosyntetyczne prokariotyczne i eukariotyczne mikroorganizmy w większości zasiedlające środowisko wodne [239], zawierające co najmniej jeden typ chlorofilu - chlorofil a. Mikroalgi, wśród nich formy prokariotyczne - cyjanobakterie (sinice, niebiesko-zielone algi - *blue-green algae*) odgrywają ważną rolę zarówno w środowisku wodnym jak i glebowym. Są uważane za najstarsze organizmy kopalne, znane już z prekambriu [198]. Mają duże znaczenie w przyrodzie jako organizmy pionierskie i wszędobylskie. Mikroalgi są obecne w przyrodzie w siedliskach słodkowodnych, morskich, bagiennych, w gorących źródłach oraz pod lodem [291]. Liczba gatunków szacowana jest na 30000, jednak biochemia i ekofizjologia jedynie 50 z nich została szczegółowo scharakteryzowana. Rola alg w oczyszczaniu środowiska jest stale coraz głębiej poznawana: istnieją możliwości zastosowania ich w oczyszczaniu ścieków. Zapotrzebowanie na mikroalgi znajduje odbicie w prężnie rozwijającym się przemyśle *AQUACULTURE*.

Mikroalgi konsumują CO_2 , który jest uznawany za gaz cieplarniany, zmniejszając jego stężenie w atmosferze. Korzystne jest połączenie oczyszczania ścieków z hodowlą komórek mikroalg, których biomasa może zostać następnie wykorzystana np. do produkcji

użytecznych substancji [131]. Mikroalgi to organizmy o bardzo interesującym metabolizmie: mimo, że większość cyjanobakterii uważanych jest za fotoautotrofy, niektóre z nich mogą rosnąć na sposób heterotroficzny i miksotroficzny [217]. Zwiększa to tolerancję i elastyczność metabolizmu, dzięki czemu mogą rozwijać się nawet w warunkach silnie zanieczyszczonych.

3.2 Systematyka

Algi (zarówno jednokomórkowe mikroalgi jak i wielokomórkowe makroalgi) to organizmy fotosyntezujące przy udziale chlorofilu oraz innych barwników. Niektóre osiągają rozmiary roślin. Najwcześniejsze próby klasyfikacji alg oparto na ich barwie - podzielono je na trzy główne grupy: zielone, brunatne oraz czerwone. Obecnie rozróżnia się od czterech do dziewięciu grup, które sklasyfikowano ze względu na skład ściany komórkowej, różnice w pigmentacji, rodzaj metabolizmu oraz składniki zapasowe (skrobia i lipidy), obecność ruchliwych składników komórki (wici) lub innych elementów morfologicznych [153]. Ich systematyka ciągle się zmienia m. in. ze względu na ogromną różnorodność oraz dopiero niedawno rozpoznane charakterystyki chemotaksonomiczne i submikroskopowe [254].

Makroalgi są zaliczane do królestwa roślin, natomiast klasyfikacja mikroalg (wśród których są zarówno prokariota jak i eukariota) nie została jeszcze dobrze zdefiniowana. Nie rozwiązany problem, który jest aktualnie tematem ożywionej debaty między mikrobiologami a botanikami jest umiejscowienie systematyczne niebiesko-zielonych alg, strukturalnie tak bardzo podobnych do bakterii, że mikrobiolodzy nazwali je *Cyanobacteriales*, podczas gdy botanicy podtrzymują, że potocznie nazywana grupa „niebiesko-zielonych” (ang. *blue-greens*) jest zbyt wyrazista by zaliczać je do bakterii i nazwali je *Cyanophyta* [254], zaliczając tym samym do królestwa roślin. Mikroalgi są również określane jako fotosyntetyczne rośliny niższe produkujące tlen z wykorzystaniem wody jako donora elektronów.

Wielu naukowców obecnie wyłącza prokariotyczne *Cyanophyceae* z alg - nazwano je terminem "cyjanobakterie" właśnie ze względu na ich prokariotyczną naturę [166].

3.3 *Spirulina*

3.3.1 Charakterystyka ogólna

W XVI w. gdy hiszpańscy kolonizatorzy zasiedlili Meksyk zaobserwowali, że żyjący w Dolinie Meksykańskiej w stolicy Tenochtitlan Aztekowie zbierali „nową żywność” z jeziora, którą opisywali jako „niebieskozielone ciasto” nazywane przez lokalnych

mieszkańców *tecuitlatl* [270]. Formalnie jednak *Spirulina* (*Arthrospira*) została odkryta dopiero w 1960 r. W raporcie, botanika Jean'a Leonarda, który był członkiem francusko-belgijskiej ekspedycji do Afryki, znajduje się opis „niebiesko-zielonego placka” sprzedawanego na targu w Fort Lamy w Czadzie. Badania wykazały, że ów placek, nazywany w lokalnym dialekcie *dihé*, zawierał niebiesko-zieloną algę zidentyfikowaną później jako *Spirulina*, która była konsumowana przez żyjące wokół alkalicznych jezior Czad i Niger plemię Kanembu. Wcześniejsze doniesienia z 1940 r. dotyczące zastosowania *dihé* przeszły w sposób niezauważony [270].

W czasie, kiedy Leonard odkrył *Spirulina* w Afryce, Institut Francais du Pétrole otrzymał zlecenie od firmy Sosa Texcoco na zbadanie zakwitu alg, pozostającego po odparowaniu wody z jeziora niedaleko Mexico City, przy produkcji wodorowęglanu sodu. Jako rezultat, powstała pierwsza systematyczna i szczegółowa praca poświęcona wzrostowi i fizjologii *Spirulina*, będąca częścią rozprawy doktorskiej Zarrouk'a [312], która dotyczyła pierwszych zakładów produkujących biomasę *Spirulina* na skalę przemysłową. W chwili obecnej to pionierskie opracowanie jest najczęściej cytowaną, podstawową pozycją poświęconą *Spirulina* [270].

3.3.2 Morfologia, ultrastruktura i taksonomia

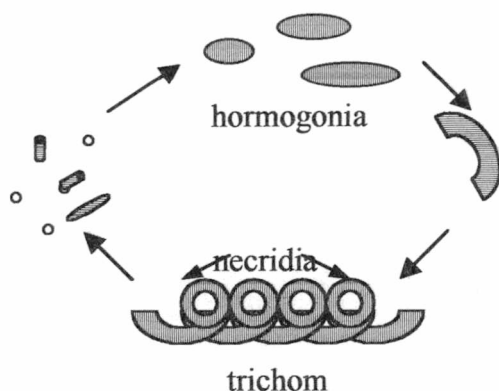
Spirulina jest uważana za ważną przemysłowo, nitkowatą mikroalgę zaliczaną do cyjanobakterii. Roczną produkcję w stawach hodowlanych szacuje się na ponad 3000 ton - najwięcej spośród wszystkich mikroalg [236]. Jest planktoniczną nitkowatą cyjanobakterią zasiedlającą masowo tropikalne i subtropikalne akweny wodne charakteryzujące się wysoką zawartością węglanów i wodorowęglanów (wysokie pH) [313, 270].

- *Morfologia*: Charakterystyczną cechą morfologiczną jest układ wielokomórkowych cylindrycznych trichomów zwiniętych w otwartą lewoskrętną helisę. Ściana komórkowa jest usytuowana poprzecznie. Grubość trichomów to 6-16 μm [270]. Pod mikroskopem świetlnym widoczne są niebiesko-zielone nie tworzące heterocyst filamenty, zbudowane z komórek wegetatywnych, które podlegają podziałowi prostemu w jednej płaszczyźnie. Podział przebiega na drodze fragmentacji: pęknięcie trichomu jest poprzeczne. *Necridia* (komórki macierzyste) zachowują się jak wyspecjalizowane komórki, pozwalając na transkomórkowe pęknięcie trichomu, z utworzeniem krótszych segmentów lub *hormogonii*. Komórki *hormogonii* podlegają procesowi powiększania i dojrzewania, zgodnie z cyklem rozwojowym (Rys. 3.3.1) [270].

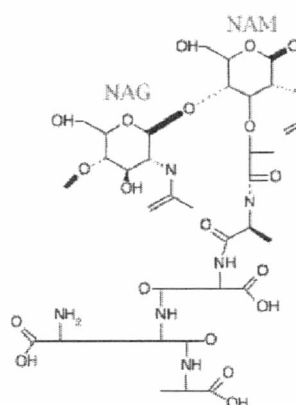
Dojrzałe trichomy rozrywają się na kilka kawałków poprzez formowanie wyspecjalizowanych komórek (*necridiów*), które podlegają lizie dając początek dwuwklęsłym

separacyjnym dyskom. Fragmentacja trichomu w necridiach powoduje powstanie ślizgających się krótkich łańcuchów (zbudowanych z dwóch lub czterech komórek), hormogonii które dadzą początek nowemu trichomowi. Komórki w hormogonium tracą dołączone części komórek necridialnych, stając się zaokrąglone na końcach dystalnych przy niewielkim pogrubieniu ścian. Podczas tego procesu cytoplazma staje się mniej granulowana a komórki ulegają zabarwieniu na jasno niebiesko-zielony kolor. W tym procesie trichom wydłuża się i osiąga typowy helikalny kształt. Przypadkowe ale spontaniczne pęknięcie trichomów łącznie z utworzeniem necridiów zapewnia wzrost organizmu [120].

- *Ultrastruktura*: Jednostką strukturalną *Spirulina* jest filament, komórka lub składający się tylko z komórek wegetatywnych *trichom*. Wewnętrzna organizacja komórki jest taka jak u prokariota, ale strukturalnie bardziej skomplikowana niż u większości bakterii. Komórka składa się z rejonu centralnego (centroplazma, nukleoplazma) bogatego w kwasy nukleinowe, rejonu peryferyjnego (chromoplazma) zawierającego fotosyntetyczne membrany tylakoidalne oraz wiele inkluzji i warstw zbudowanych z plazmalemmy [165]. Komórka wykazuje otoczkę charakterystyczną dla ściany komórkowej bakterii gram-ujemnych. Trichomy są otoczone cienką osłonką, posiadającą włóknistą, usieciowaną strukturę [219, 270].



Rys. 3.3.1
Cykl życiowy *Spirulina* [120]



Rys.3.3.2
Peptydoglikan

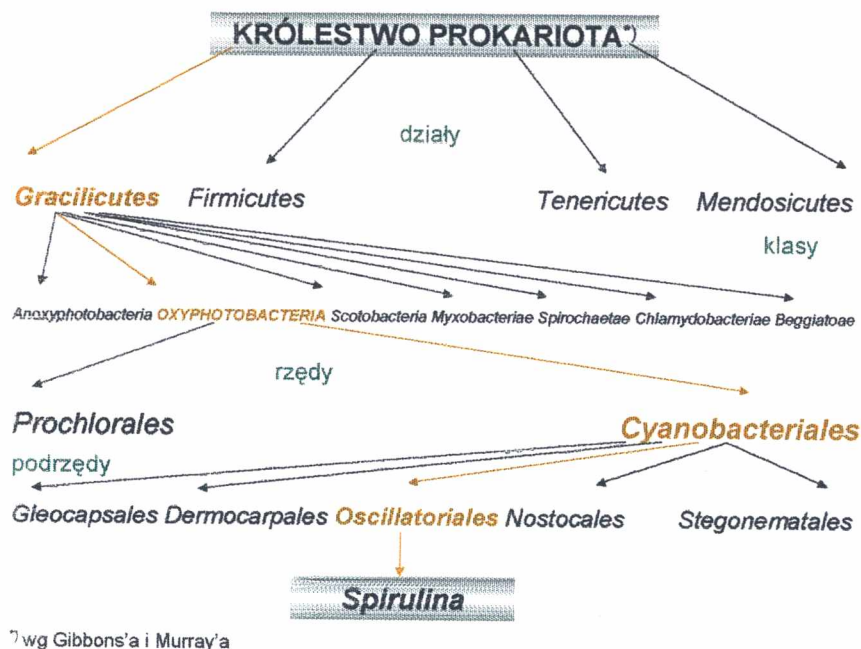
Wielowarstwowa ściana komórkowa jest cienka (ok. 40-60 nm), porowata, zbudowana z peptydoglikanu (Rys. 3.3.2). Pod warstwą ściany komórkowej znajduje się otaczająca cytoplazmę błona komórkowa, bogata w subkomórkowe inkluzje, typowe dla cyjanobakterii. Skład ściany komórkowej niebieskozielonych alg przypomina ścianę bakterii: zawiera pektynę, mureinę, kwas muraminowy oraz kwasy α, ϵ -diaminopimelinowe. W ścianie komórkowej znajdują się pory, dzięki czemu pozwalającą cząsteczki i jony mogą swobodnie ją przenikać [68]. Regularnie rozmieszczone warstwy ściany komórkowej dzielą trichom na komórki, połączone *plazmodesmą*. Jest odporna na działanie szkodliwych substancji wchodzących do komórki [186, 190].

W peryferyjnym rejonie komórki jest cytoplazma wypełniona głównie granulkami poliglukanu oraz wakuolami gazowymi. Znajdują się tu również granule osmiofilowe, fibryle oraz kropelki lipidów. Tylakoidy są ułożone równolegle i są powiązane z fikobilisomami. W centralnym rejonie cytoplazmy znajdują się karboksosomy oraz ciała cylindryczne [120].

Składniki ściany komórkowej prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w wiązaniu kationów metalu. Stosunek grup kwasowych peptydoglikanu do zasadowych obecnych na powierzchni komórek wykazuje, przewagę grup słabo kwaśnych, a zatem w pH obojętnym grupy funkcyjne na powierzchni komórek *Spirulina* powinny wykazywać tendencje do wiązania obecnych w roztworze kationów [44].

- *Taksonomia*: Według oficjalnej terminologii mikrobiologicznej (klasyfikacja wg Gibbons'a i Murray'a) (Rys. 3.3.3) [133] *Spirulina* sp. jest zaliczana do klasy tlenowych bakterii fototroficznych, do rzędu sinic (*Cyanobacteriales*), podrzędu *Oscillatoriales* - formy nitkowate nie tworzące heterocyst. Natomiast zwyczajowo, jest określana mianem „niebieskozielonych glonów”. Istnieje wiele nieporozumień i kontrowersji związanych z nazewnictwem i klasyfikacją *Spirulina* zarówno w języku polskim jak i angielskim.

Sinice (tlenowe bakterie fototroficzne) zalicza się wraz z bakteriami do *Schizophyta*. Z powodu jednak cech fizjologicznych wspólnych z roślinami zielonymi włączono je również do królestwa roślin jako glony niebieskozielone i traktowano zgodnie z zasadami taksonomicznymi stosowanymi przez botaników [72, 117, 249].



Rys. 3.3.3

Spirulina w systematyce mikrobiologicznej [250]

W literaturze zwyczajowo i najczęściej używa się wyrażen, które już od dłuższego czasu łączy się: *blue-green alga Spirulina* lub *microalga Spirulina*. Znacznie rzadziej używa

się terminu *cyanobacteria Spirulina*, mimo że jest to zgodne z oficjalną klasyfikacją mikrobiologiczną. Wiąże się to prawdopodobnie z kojarzeniem większości cyjanobakterii z organizmami produkującymi substancje toksyczne, których *Spirulina*, jako nieliczna spośród cyjanobakterii nie wytwarza, dzięki czemu może być spożywana przez człowieka oraz stosowana w procesach oczyszczania ścieków. W niniejszej pracy terminy określające *Spirulina*: cyjanobakteria, mikroalga oraz niebiesko-zielony glon będą stosowane zamiennie.

3.4 Metabolizm mikroalg

3.4.1 Pojęcia podstawowe

Kompleksowość i nieład panujący w terminologii troficznej alg występuje ze względu na nakładanie się wielu rodzajów metabolizmu oraz możliwość zmiany metabolizmu w odpowiedzi na czynniki środowiskowe [120, 192]. Wśród alg rozróżnia się trzy główne formy odżywiania: **autotrofia** (lub *litotrofia* (od greckiego *lithos* - kamień, *trophein* - pożywienie)), **heterotrofia** (od greckiego *heteros* - inny) oraz **miksotrofia** (Rys. 3.4.1, Tabela 3.4.1). Dodatkowo, każdą z form metabolizmu podzielono na podgrupy [120].



Rys. 3.4.1

Relacje pomiędzy terminami opisującymi główne rodzaje metabolizmów.

Inny niż autotroficzny metabolizm u mikroalg odkryto stosunkowo niedawno [25-28, 109, 164, 179-182, 292, 307, 315, 316]. Heterotrofia, lub składająca się z autotrofii i heterotrofii miksotrofia, nie jest cechą wszystkich cyjanobakterii, a jedynie kilku szczepów. U niektórych gatunków mikroalg metabolizm węgla może się zmieniać: od autotrofii do heterotrofii opierając się na zdolnościach alg, fotoautotroficznych z natury, do wykorzystywania zarówno węgla ze źródeł nieorganicznych jak i organicznych. Ta elastyczność - zdolność do przestawiania metabolizmu z autotroficznego na heterotroficzny wskazuje na wysokie zdolności adaptacyjne (Rys. 3.4.1) [13] oraz możliwość reakcji na warunki środowiskowe.

Tabela 3.4.1
Podstawowa charakterystyka metabolizmów

AUTOTROFIA (samożywność) synteza prostych związków organicznych (węglowodanów) z asymilowanego dwutlenku węgla przy udziale energii pochodzącej z fotosyntezy (energii świetlnej przekształconej w energię wiązań chemicznych) lub chemosyntezy (energia reakcji chemicznych) przez organizmy roślinne (także niektóre bakterie) [198]. Fotoautotrofia (fotolitotrofia) to wzrost na świetle z wykorzystaniem CO₂ jako jedyne źródła węgla do syntezy materiału komórkowego. Energia do wzrostu pochodzi tylko ze światła [192].

HETEROTROFIA (heterotrofizm, cudzożywność) to odżywianie substancją organiczną (np. glukoza) wykorzystywaną do prowadzenia własnych procesów życiowych, np. pobieranie materii innych organizmów żywych [198]. Substrat organiczny jest wykorzystywany jako źródło energii i węgla. U mikroalg zdarza się, że wzrost jest możliwy w całkowitej ciemności (np. *Chlorella*). Jednak w niektórych przypadkach światło jest wymagane do asymilacji substratu, choć przy natężeniu światła znacznie niższym od tego, który podtrzymuje wzrost fotoautotroficzny [192].

MIKSOTROFIA (fotolitotroficzna (fotoautotroficzna) heterotrofia) - wzrost na świetle w obecności CO₂, ale z dodatkowym substratem organicznym, który jest fotometabolizowany podczas wzrostu [192]. Fotoheterotrofia (fotoorganotrofia=fotoasymilacja=fotometabolizm) - pojęcie to odnosi się do rodzaju metabolizmu, w którym wykorzystywaniu związków organicznych (jako źródła węgla) towarzyszy korzystanie z energii światła [120].

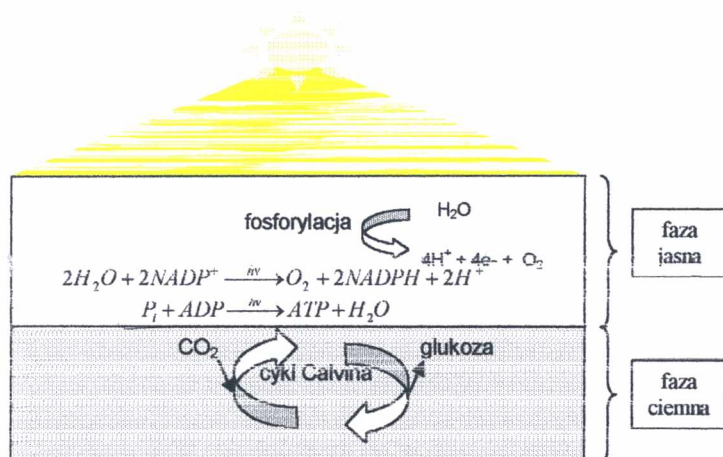
Mikroalgi fotoautotroficzne wykorzystują światło jako jedyne źródło energii do rozkładu cząsteczek wody. Energia wyprodukowana w tej reakcji jest wykorzystywana do wiązania (redukcji) dwutlenku węgla. W warunkach heterotroficznych energia wymagana do wzrostu jest dostarczana w procesie oddychania z wykorzystaniem organicznego źródła węgla jako substratu. W tych dwóch przypadkach wykorzystywane są różne źródła energii, operując na wyrażnie innych procesach metabolicznych. W warunkach miksotroficznych oba procesy zachodzą równocześnie.

3.4.2 Fotoautotrofia - fotosynteza

Fotosynteza jest definiowana jako „synteza z pomocą światła” [101, 165, 254], a organizmy ją przeprowadzające określane są terminem *fotoautotrofy*. Jest to proces metaboliczny dzięki któremu organizmy fotoautotroficzne np. bakterie fotosyntetyczne, cyjanobakterie i rośliny wyższe konwertują energię świetlną w energię zmagazynowaną w związkach chemicznych w postaci m.in. węglowodanów w cyklu Calvina [303] - energię dostępną dla funkcji metabolicznych organizmów żywych [293]. Zatem, fotosynteza generuje powstanie materii organicznej z materiałów nieorganicznych (CO₂ i H₂O), produkując jednocześnie tlen. Miejscem zachodzenia reakcji fotosyntetycznej są błony tylakoidalne. Wydajność wykorzystania energii świetlnej (w stosunku do energii dostarczonej) jest niska - zaledwie 5 %. Większość energii jest tracona w postaci ciepła lub jest reemitowana jako fluorescencja [165]. Ogólne równanie reakcji zachodzącej podczas fotosyntezy jest następujące [198]: $CO_2 + 2H_2O \xrightarrow{h\nu} [CH_2O] + H_2O + O_2 + 2872kJ$

Energia świetlna jest pochłaniana przez pigmenty fotosyntetyczne: chlorofil, fikocyjanobiliny, karotenoidy i in. [186], dzięki którym rośliny wykorzystują promieniowanie słoneczne w zakresie 400-740 nm (PAR - promieniowanie aktywne fotosyntetycznie). Najważniejszym barwnikiem asymilacyjnym jest chlorofil a, pochłaniający światło fioletowe

i niebieskie oraz niebieskie i pomarańczowe. Częsteczki chlorofilu są ułożone w fotosystemach (PSI oraz PSII) i zachowują się jak anteny przekazujące energię do centrów fotosystemów. W każdym fotosystemie znajduje się kilkaset cząsteczek chlorofilu, w których występują podwójne wiązania, z których elektrony są wybijane jako skutek absorpcji fotonów. Gdy cząsteczka chlorofilu zaabsorbuje światło, zostaje wzbudzona. Może stracić swoją energię poprzez przekazanie jej na inną cząsteczkę chlorofilu. Energia ta jest przekazywana dalej, aż do specjalnej cząsteczki chlorofilu (P680) w centrum reakcji PSII. Gdy cząsteczka ta zostaje wzbudzona, traci elektron, który przemieszcza się do fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów (cytochromy - zestaw białek i innych związków chemicznych) [101, 254].



Rys. 3.4.2

Jasna i ciemna faza procesu fotosyntezy

W przebiegu fotosyntezy wyróżnia się dwie fazy (Rys. 3.4.2):

- 1) **fazę jasną** (absorpcja energii świetlnej [198, 221], energia słoneczna pochłaniana jest przez chlorofil - w wyniku fosforylacji fotosyntetycznej powstaje ATP, redukcja NADP^+ i fotoliza wody) oraz
- 2) **fazę ciemną** (cykl Calvin'a, wbudowanie CO_2 do związków organicznych i powstanie glukozy - proces ten zachodzi z wykorzystaniem energii zgromadzonej w ATP i jest zasilany energią z fazy jasnej [221]).

Z fotosyntezą związany jest również proces odwrotny: oddychanie, czyli powolne spalanie materii organicznej z wytworzeniem wody i CO_2 oraz uwolnieniem energii chemicznej w postaci ciepła oraz wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych [204, 205]. Przewaga fotosyntezy nad oddychaniem pozwala na wzrost organizmów fotosyntetycznych oraz magazynowanie energii świetlnej [293].

3.4.3 Heterotrofia i mikсотrofia

Tlenowy wzrost heterotroficzny potwierdzono doświadczalnie u co najmniej 4 fotosyntezujących szczepów jednokomórkowych niebiesko-zielonych alg: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*, *Spirulina* [17-182, 292], gdzie jako związek organiczny wykorzystano glukozę, pepton lub octan. W warunkach heterotroficznych komórki mikroalg nie korzystają ze światła: rosną w ciemności. Energia do wzrostu pochodzi wówczas z oddychania z wykorzystaniem węgla organicznego jako substratu. Wzrost heterotroficzny *Spirulina sp.* zaobserwował jedynie Marquez [179-182]. W przypadku mikсотrofii natomiast zachodzą jednocześnie dwa procesy o zupełnie innej naturze (autotrofia - fotosynteza i

heterotrofia-oddychanie) [27, 28, 96-98, 112, 179-182, 200, 201, 238, 292]. Miksotrof to organizm czerpiący energię zarówno ze źródeł organicznych jak i nieorganicznych (np. glukoza + wiązanie węgla na drodze fotosyntezy), a więc jest połączeniem procesów heterotrofii i autotrofii u tego samego organizmu [111].

W literaturze rozróżnia się trzy formy miksotrofii [111]:

1. **fagotrofy** - organizmy którym światło jest niezbędne do wzrostu, ale mogące wspomagać odżywanie heterotrofią
2. **fotosyntezujące fagotrofy** - heterotrofy, które przy braku substratu organicznego prowadzą fotosyntezę
3. **miksotrofy właściwe** - heterotrofy lub autotrofy w zależności od stosunku stężenia substratu organicznego do natężenia światła

Typowe stężenia *Spirulina* (podobnie jak szybkość namnażania biomasy osiągane w hodowli fotoautotroficznej) są bardzo niskie: 0.4-0.6 g/dm³ [225]. Generuje to konieczność stosowania olbrzymich stawów do hodowli mikroalg w trybie ciągłym, w celu osiągnięcia wymaganych długich czasów przebywania. Wykorzystanie alternatywnego, organicznego źródła węgla jest szansą na zwiększenie szybkości przyrostu i stężeń biomasy.

Większość prac poświęconych hetero- i miksotrofii u mikroalg to prace pionierskie o charakterze raczej półilościowym. Znajdują się tam jedynie informacje o stymulującym wpływie organicznego źródła węgla na końcowe stężenie komórek. Marquez i in. [179-182], Chen i in. [27, 28, 111] oraz Ogawa i Terui [199] wykazali, że *Spirulina* może wykorzystywać glukozę jako źródło węgla organicznego [294]. Zaobserwowano, że przy wzroście miksotroficznym specyficzna szybkość wzrostu oraz końcowe stężenie komórek są wyższe niż w hodowli autotroficznej [179-182, 109, 119, 292, 293]. Prowadzono hodowlę na pożywce wzbogaconej w glukozę zawierającą izotop ¹⁴C przez 80 h. Glukoza została całkowicie skonsumowana. 50 % izotopu ¹⁴C zostało wbudowane w biomasę, pozostała ilość została wydzielona w postaci CO₂ [120]. Również doświadczenia Chen'a i in. [27, 28] wykazały, że dodatek glukozy oraz octanu do pożywki powodował zwiększenie szybkości wzrostu. Najwyższą specyficzną szybkość wzrostu oraz stężenie komórek uzyskano w hodowli na glukozie przy stężeniu 2,5 g/dm³ (temperatura hodowli 30 °C) [27, 28]. Przy natężeniu światła powyżej 12,4 W/m² zaobserwowano efekt fotoinhibicji. Po zmniejszeniu natężenia światła do 6,2 W/m², odpowiednie stężenie glukozy do produkcji biomasy przesunęło się z 2,5 do 5,0 g/dm³ [27, 28]. Zjawisko to wyjaśniono w oparciu o mechanizm metabolizmu. W hodowli miksotroficznej, fotosynteza oraz oksydacyjny metabolizm glukozy zachodzą jednocześnie [179-182]. Przy stosunkowo wysokim natężeniu światła fotosynteza może jednak dominować, natomiast przy niskim natężeniu światła oksydacyjny metabolizm

glukozy powinien przeważać. Wielu autorów stwierdziło, że warunki miksotroficzne (hodowla na świetle i przy obecności substratu organicznego) stymulują wzrost, wykazując że produktywność biomasy w warunkach miksotroficznym była ok. 2 krotnie wyższa niż w autotroficznym, z jednoczesnym dwukrotnym zwiększeniem specyficznej szybkości wzrostu (μ) [179, 292] - hodowla miksotroficzna umożliwia bowiem uzyskanie wyższych końcowych stężeń komórek. W takim procesie zarówno organiczne źródło węgla jak i energia świetlna są jednocześnie dostarczane do fotobioreaktora. Szybkość wzrostu w hodowli miksotroficznej zależy co prawda od natężenia światła, ale jest znacznie mniej wrażliwa na jego brak lub zbyt duże natężenie [292]: efekt fotoinhibicji (zazwyczaj obserwowany przy natężeniu światła powyżej 60 W/m²) [33-36] jest słabiej zauważalny [13].

Problemem aktualnie dyskutowanym w literaturze jest czy auto- i heterotrofia składające się na miksotrofię, działają niezależnie, czy wpływają na siebie, czy może istnieją oddzielne komórki auto- i heterotroficzne w hodowli miksotroficznej. Badania nad metabolizmem miksotroficznym *Spirulina sp.* prowadził najintensywniej Marquez, według którego miksotrofia jest prostą sumą metabolizmu autotroficznego i heterotroficznego [179-182]. Jeżeli całkowita wydajność wzrostu *Spirulina* w hodowli miksotroficznej to suma udziałów wzrostu autotroficznego na świetle oraz heterotroficznego w ciemności [180], można przypuszczać, że aktywność fotosyntetyczna oraz zależna od organicznego węgla aktywność oddechowa działają niezależnie w tych komórkach. Zaobserwowano morfologiczne zmiany indukowane u *Spirulina* wyhodowanej miksotroficznie [109], ale niewiele wiadomo o zmianach wywołanych przez wzrost miksotroficzny na aktywność fotosyntetyczną oraz reakcję na światło [120]. Vonskak [292] nie zgadza się z hipotezą Marquez'a [179-182]. Według niego autotrofia i heterotrofia mają wspólny łącznik, a mianowicie składniki łańcucha transportu elektronów fotosyntezy są dzielone z oddechowym łańcuchem transportu elektronów (kompleks cytochromu b6f). Dane prezentowane przez Vonshak'a [292] wykazały, że komórki miksotroficzne potrzebują mniej światła do wzrostu. Zatem wydajność wzrostu w stosunku do wykorzystania światła jest wyższa w hodowli miksotroficznej, również specyficzna szybkość wzrostu oraz maksymalne stężenie biomasy uległy wysyceniu przy niższym natężeniu światła niż hodowla autotroficzna.

Stężenie biomasy oraz pigmentów fotosyntetycznych dla wzrostu miksotroficznego są 1,5-2-krotnie wyższe w porównaniu do hodowli fotoautotroficznej. Jednak zawartość pigmentów w biomase mikroalg miksotroficznym była prawie identyczna jak u fotoautotroficznym [179]. Marquez [182] opublikował pracę dotyczącą określenia wydajności bioenergetycznej z wykorzystaniem hodowli ciągłej w warunkach autotroficznym

i miksotroficznych wykazując, że przy każdej szybkości rozcieńczania hodowla miksotroficzna miała większą wydajność bioenergetyczną. Zmiany w zawartości pigmentów w obu hodowlach były lepiej skorelowane z natężeniem światła niż ze sposobem dostarczania źródła węgla.

Ze względu na obecność związku organicznego, który może służyć jako donor elektronów, można się spodziewać reakcji denitryfikacji (redukcja azotanów do azotu molekularnego), która normalnie towarzyszy wzrostowi heterotroficznemu. Taka hipoteza wymagać będzie jednak dokładnej weryfikacji doświadczalnej.

3.4.4 Stechiometria wzrostu mikroalg

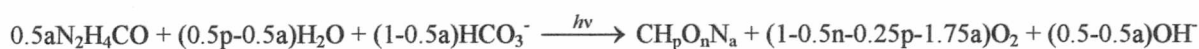
W każdym z rozpatrywanych metabolizmów stechiometria wzrostu jest inna. Uproszczone równania stechiometryczne wzrostu mikroalg przedstawiają się następująco:

Tabela 3.4.2
Stechiometria wzrostu *Spirulina* w metabolizmie auto-, hetero- i miksotroficznym

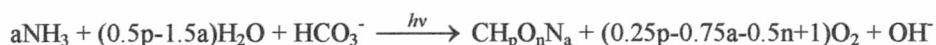
metabolizm	równanie stechiometryczne
autotroficzny	$a \text{NO}_3^- + (0.5p+0.5a) \text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^- \xrightarrow{h\nu} \text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_a + (0.25p-0.25a-0.5n+1)\text{O}_2 + (h+1) \text{OH}^-$
heterotroficzny	$a \text{NO}_3^- + (1+a) \text{CH}_2\text{O} + (0.25p+0.25a+0.5n) \text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_a + a \text{HCO}_3^- + (0.5p+0.5a+1)\text{H}_2\text{O}$
miksotroficzny	$a \text{NO}_3^- + (1-d) \text{CH}_2\text{O} + (0.5+0.5n-0.5p-1.5d) \text{O}_2 + d \text{HCO}_3^- \xrightarrow{h\nu} \text{CH}_p\text{O}_n\text{N}_a + (2-d-p) \text{OH}^-$ gdy $d>0$ i $p+3d-n>1$ wówczas w metabolizmie dominuje autotrofia, w przeciwnym przypadku: heterotrofia

Podczas wzrostu autotroficznego następuje alkalizacja środowiska głównie ze względu na konsumpcję gazowego dwutlenku węgla przez komórki ($\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$). W przypadku heterotrofii pożywka jest zakwaszana na skutek produkcji CO_2 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). W hodowli miksotroficznej pH powinno być względnie stałe.

W przypadku gdy źródłem azotu jest mocznik, a źródłem węgla wodorowęglan, równanie bilansu chemicznego wzrostu alg przedstawia się następująco [155]:



Gdy źródłem azotu jest amoniak, równanie chemiczne bilansu masy ma postać [188]:



Gdy źródłem azotu są azotany, należy wykorzystać energię do przekształcenia azotu azotanowego w azot amonowy, który w takiej postaci jest obecny w biomacie [226]:



W hodowli *Spirulina sp.* zalecane jest jednak stosowanie azotu azotanowego jako źródła azotu, gdyż minimalizuje to ryzyko zakażenia hodowli.

4. HODOWLA BIOMASY

Zarówno przy rozważaniu procesu biosorpcji, jak i bioakumulacji niezbędne jest przeprowadzenie prac nad hodowlą biomasy: w biosorpcji wykorzystuje się uprzednio wyhodowane komórki, natomiast w bioakumulacji przebiega usuwanie jonów metali podczas hodowli.

4.1 Czynniki wpływające na wzrost

W hodowli mikroalg ważne jest zapewnienie odpowiednio krótkiej drogi penetracji światła (nie przekraczającej 30 cm), niskiej gęstości populacji, odpowiedniej szybkości mieszania oraz odpowiedniego, jednorodnego natężenia światła z dobranym fotoperiodem [170, 171].

4.1.1 Światło

Bez wątpienia, światło jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na wzrost organizmów fotosyntezujących, jest głównym czynnikiem limitującym oraz głównym źródłem energii. Większość prac poświęconych hodowli *Spirulina* dotyczy wpływu światła na szybkość wzrostu w warunkach fotoautotroficznych. Pierwsza szczegółowa praca w tym zakresie została przeprowadzona przez Zarrouk'a w 1966 r. [312]. Badacz ten wyznaczył krytyczne natężenie światła ($I=72 \text{ W/m}^2$) powyżej którego, dalsze zwiększanie jego natężenia nie będzie powodować zwiększenia szybkości wzrostu. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Vonshak'a krytyczne natężenie światła to 38 W/m^2 . Stanowi to ok. 10-15 % natężenia światła słonecznego w zakresie 400-700 nm (w południe podczas przesilenia wiosennego w słoneczny dzień 45°N) [234, 294]. Inni badacze podają, że natężenie padającego światła powinno być mniejsze niż 100 W/m^2 [241].

Natężenie światła powinno być dostosowane do gatunku mikroalg i fotobioreaktora. Zbyt niskie powoduje zmniejszenie wydajności biosyntezy ze względu na obniżenie jej szybkości. Z drugiej strony, fotoutlenianie i fotoinhibicja powodują znacznie większe spustoszenie niż niedobór światła, ze względu na uszkodzenie komórek. Również wahania w dziennym natężeniu światła nie powinny być znaczne. Dodatkowo, natężenie światła powinno być ustalone, gdyż algi potrzebują okresu adaptacji do nowych warunków świetlnych, którego długość zależy od gatunku alg i zwykle wynosi ok. kilka godzin. Ze względu na ograniczony dostęp światła i efekt tzw. samozacieniania, stężenie komórek w hodowli jest niskie i zwykle nie przekracza w komercyjnych fotoautotroficznych stawach hodowlanych $400\text{-}600 \text{ mg/dm}^3$ [220].

Zaobserwowano istnienie związku pomiędzy natężeniem światła i temperaturą: podwyższenie temperatury powoduje wzrost wartości krytycznego natężenia światła procesu fotosyntezy [278]. Dla większości alg temperatura ma największy wpływ na metabolizm oddychania w ciemności. Dla większości szczepów hodowanych przemysłowo w otwartych zbiornikach ważne są dobowe wahania temperatury oraz natężenia światła. Temperatura hodowli ma również wpływ na skład chemiczny komórek alg [256]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że podwyższona temperatura, w połączeniu z warunkami stresu chemicznego, zwiększa zdolności biosorpcyjne [293]. Natomiast utrzymywanie temperatury hodowli na stałym poziomie 35 °C umożliwi utrzymanie stałej, dużej wydajności produkcji [293].

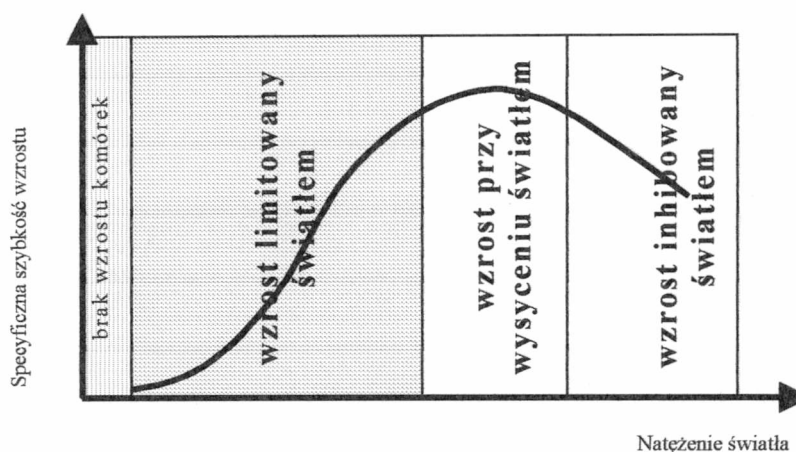
W polskich warunkach klimatycznych hodowla *Spirulina* w otwartych zbiornikach wydaje się niemożliwa. Konieczne będzie zatem konstruowanie termostatowanych fotobioreaktorów. Wykorzystanie np. energii geotermalnej (jeśli to możliwe słonecznej) lub ciepła nadmiarowego z zakładów przemysłowych do podgrzania stawów hodowlanych do odpowiedniej temperatury wzrostu polepszy parametry ekonomiczne procesu.

Mieszanie ma znaczenie dla równomiernej dystrybucji światła w hodowli. Gdy jest niewystarczające, komórki znajdujące się w pobliżu źródła światła są narażone na fotoinhibicję, natomiast komórki znajdujące się daleko są całkowicie jego pozbawione. W tej sytuacji pomimo zapewnienia odpowiedniego do wzrostu średniego natężenia światła, warunki świetlne w reaktorze będą niekorzystne. Zbyt intensywne mieszanie może jednak spowodować rozbicie komórek, szczególnie w przypadku hodowli alg nitkowatych, do których należy *Spirulina*. Mają one większą tendencję do rozbijania i do wylewania białkowych składników komórkowych do medium wzrostowego.

Aparat fotosyntetyczny nie tylko wykorzystuje światło, ale również może zostać przez nie zniszczony. Proces inaktywacji fotosyntezy (fotoinhibicja) jest definiowany jako utrata pojemności fotosyntetycznej jako skutek zniszczenia komórek przez zbyt dużą gęstość strumienia fotonów, nadmiernego w stosunku do poziomu wymaganego do fotosyntezy [87, 115]. Fotoinhibicja została dobrze zbadana i jest szeroko udokumentowana dla alg i roślin wyższych [53, 95, 290]. Objawia się osłabieniem procesów fotosyntetycznych czego konsekwencją jest zmniejszenie wydajności przyrostu biomasy, a w skrajnych przypadkach obumarciem całej hodowli [226]. Przebiega przy supra-optimalnym natężeniu światła, prowadząc do destrukcji pigmentów fotosyntetycznych. Zjawisko fotoinhibicji w laboratoryjnych hodowlach *Spirulina* zostało po raz pierwszy zbadane przez Kaplan'a [119], który zaobserwował obniżenie aktywności fotosyntetycznej przy wyeksponowaniu komórek

Spirulina na wysokie natężenie światła przy jednoczesnym deficycie dwutlenku węgla. Wówczas obniżenie aktywności fotosyntetycznej następowało jako skutek akumulacji H_2O_2 [294]. Rezultatem tego jest nadmierne utlenianie światłozależne (fotoutlenianie) komórek [213], które występuje najczęściej po lag fazie [226]. Fotoinhibicja występuje gdy nadmiar energii świetlnej powoduje, że łańcuch transportu elektronów staje się przeciążony lub gdy w środowisku nie występuje CO_2 , który może ulec asymilacji (gdy absorpcja światła nadal przebiega) [257, 263]. Wówczas wzbudzona cząsteczka chlorofilu traci wzbudzony elektron w reakcji chemicznej z tlenem. Powstają wysoko reaktywne rodniki tlenowe (np. nadtlenkowy: O_2^*), które atakują składniki komórkowe: następuje zniszczenie aparatu fotosyntetycznego oraz całej komórki [221, 261].

Na Rys. 4.1.1 [98] przedstawiono wpływ natężenia światła na specyficzną szybkość wzrostu komórek fotoautotroficznych. W celu zapewnienia odpowiedniego natężenia światła wszystkim komórkom, jego natężenie w reaktorze powinno być jednorodne. Może to zapewnić pełne przemieszanie oraz krótka droga penetracji światła [200].



Rys. 4.1.1

Wpływ natężenia światła na hodowlę fotoautotroficzną mikroalg [98]

4.1.2 Źródło węgla

Komórki *Spirulina sp.* jako miksotrofy mogą wykorzystywać nieorganiczne (CO_2) lub organiczne (np. glukoza) źródło węgla. Wszystkie organizmy fotosyntezujące asymilują CO_2 , z jednoczesną produkcją O_2 . Nieorganiczne źródło węgla można dostarczać zarówno w postaci CO_2 jak i HCO_3^- . CO_2 jest obecny w powietrzu, ale jego stężenie jest zbyt niskie (0,03 %) by na drodze absorpcji mogło zapewnić odpowiedni poziom węgla nieorganicznego hodowli mikroalg. W związku z tym stosuje się powietrze wzbogacone w CO_2 (1 %) lub dodanie wodorowęglanu do pożywki [120].

W zależności od pH obserwuje się dominację różnych form w roztworze zawierającym węglany: CO_2 (pH kwaśne), HCO_3^- (pH obojętne), CO_3^{2-} (pH alkaliczne) [96,

112]. Podczas hodowli, pH pożywki zmienia się [223-225, 227, 270], m.in. na skutek wprowadzania do komórek gazowego CO₂ z wodorowęglanów: $HCO_3^- \leftrightarrow CO_2 + OH^-$ czemu towarzyszy alkalizacja środowiska [233]. Odpowiednie pH wzrostu *Spirulina* jest alkaliczne, co jednocześnie minimalizuje straty węgla nieorganicznego do atmosfery [96-98].

Komórki *Spirulina* są w stanie rosnać na różnych organicznych źródłach węgla, które stymulują wzrost (tryb heterotroficzny lub miksotroficzny). Ogawa i Terui [199] jako pierwsi opisali wzrost *Spirulina* na pożywce mineralnej wzbogaconej w 1 % pepton i uzyskali wyższą szybkość wzrostu w fazie logarytmicznej oraz liniowej w porównaniu do hodowli na pożywce minimalnej. Zaobserwowano odpowiednio 1,2-1,3 oraz 1,85-1,93 krotnie zwiększenie niż szybkości wzrostu [294]. Efektywność wzrostu na peptonie jako jedynym źródle węgla organicznego przetestowano w hodowli limitowanej światłem. Glukoza również wpłynęła na wydajność wzrostu, zaś połączenie 0,1 % peptonu i 0,1 % glukozy spowodowało podwojenie szybkości wzrostu w porównaniu do hodowli bez organicznego źródła węgla [294].

Zwiększenie szybkości wzrostu w obecności glukozy sugeruje, że u mikroalg *Spirulina* zachodzi aktywność oddechowa nawet w obecności światła. Aktywność fotosyntetyczną (produkcja O₂) oraz oddechową (konsumpcja O₂) badano w hodowlach na glukozie w obecności lub przy braku 5 mmol/dm³ DCMU (3-(3,4-dichlorofenylo)-1, dimetylomocznik - inhibitor fotosyntezy). Aktywność oddechowa wykazała, że światło nie miało wpływu na szybkość konsumpcji O₂, bez względu na obecność DCMU. W obecności DCMU nie zaobserwowano aktywności fotosyntetycznej. Komórki hodowane na sposób heterotroficzny wykazywały bardzo obniżoną aktywność fotosyntetyczną. Prawdopodobnie dlatego, że zawartość pigmentów, takich jak chlorofil a, karotenoidy i fikocyjaniny w komórkach występowały w niższym stężeniu niż w przypadku kultur auto- i miksotroficznych. Wyniki wykazały, że metabolizm miksotroficzny, autotroficzny i heterotroficzny występują niezależnie u *Spirulina* bez interakcji [180]. W ostatniej publikacji Marquez [179] również sugerował, że CO₂ wyprodukowany na drodze heterotroficznej z metabolizmu glukozy może być wykorzystywany fotosyntetycznie, razem z wodorowęglanem z pożywki wzrostowej [294].

4.1.3 Źródło azotu

W hodowli *Spirulina* zaleca się stosowanie azotu-azotanowego (mimo, że jest nieco gorzej przyswajalny niż azot-amonowy), gdyż minimalizuje to ryzyko zakażenia hodowli innymi mikroorganizmami [144].

4.1.4 Składniki mineralne

Skład pożywki stosowanej do hodowli alg w celach masowych niekoniecznie będzie identyczny ze składem pożywki alg hodowanych jako biosorbenty [226, 270]. W przypadku takiej hodowli stosuje się tańsze podłoża, o niższym stopniu czystości, gdyż produkt końcowy nie będzie przeznaczony dla człowieka, do użytku wewnętrznego [163, 270].

Podczas gdy niektóre gatunki mikroorganizmów są w stanie tolerować stężenia jonów (również metali ciężkich) jedynie na poziomie mmol/dm^3 , algi wykazują zwiększoną tolerancję, będąc w stanie rosnąć również w solankach [223]. Niektóre szczepy mogą zaadaptować się do wysokiego stężenia lub pewnego typu jonów. Rozważając adaptację w stosunku do np. chlorku sodu, algi można podzielić na dwie główne grupy: halotolerancyjne i halofilne [264]. Pierwsza z tych grup posiada fizjologiczne mechanizmy odpowiedzi, które pozwalają na egzystencję w wysoko zasolonym medium, natomiast druga wymaga wysokiego stężenia jonów w pożywce do wzrostu [120]. Obecnie trwają intensywne badania nad adaptacją pewnych alg do wysokiego stężenia jonów, m.in. poprzez modyfikacje ściany komórkowej, czy wyizolowanie szczepów odpornych [270].

4.1.5 Inne czynniki wpływające na wzrost

Każdy gatunek mikroalg ma pewne wymagania dotyczące pH, które ma istotny wpływ na dysocjację soli i kompleksów (m.in. pierwiastków śladowych) [120]. Jeżeli mikroalgi posiadają optimum wzrostowe w pH kwaśnym, straty spowodowane ulatnianiem CO_2 będą znaczne, natomiast w zasadowym powinny być niewielkie [155]. Mikroalgi *Spirulina* rosną w pH alkalicznym: 8-9,5. pH zmienia się w trakcie hodowli: w hodowli autotroficznej rośnie (jako skutek konsumpcji CO_2), w heterotroficznej maleje (jako skutek produkcji CO_2), w miksotroficznej pozostaje na stałym poziomie [144].

Gęste monokultury alg produkują tlen w stężeniu przekraczającym $35 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ [223]. Stężenie tlenu osiąga wówczas poziom toksyczny i powoduje reakcje fotoutleniania. Dlatego, niezbędne jest zapewnienie odpowiedniej wymiany gazowej, np. poprzez aktywne przepuszczanie powietrza, w celu desorpcji tlenu. Dodatkowo, intensywne napowietrzanie powoduje mieszanie oraz dostarcza niezbędnego do wzrostu dwutlenku węgla. Inna sytuacja będzie zachodzić w metabolizmie heterotroficznym, gdzie O_2 jest substratem, a CO_2 produktem.

4.2 Model wzrostu

Szybkość wzrostu *Spirulina* może być opisywana w sposób taki jak typowych mikroorganizmów, ponieważ wzrost przebiega przez podział prosty komórki (bez etapu płciowego, czy różnicowania) [15, 71, 294].

4.2.1 Hodowla okresowa

- Modele jednosubstratowe

Zaproponowano wiele modeli opisujących zależność stężenia substratu limitującego wzrost od specyficznej szybkości wzrostu, np. model Monoda [153-156, 187]

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (4.2.1)$$

Równanie Monoda najczęściej jest stosowane do opisu szybkości wzrostu organizmów heterotroficznych, gdzie substratem limitującym wzrost jest glukoza. W Tabeli 4.2.1 przedstawiono przykładowe, literaturowe modele wzrostu mikroorganizmów fotosyntetycznych (tu: traktuje się natężenie światła jako substrat, mimo że nie jest substratem chemicznym) oraz heterotroficznych. Modele te mają charakter empiryczny - nie wnikają w naturę opisywanego procesu. W przypadku mikroorganizmów fotosyntetycznych światło jest zwyczajowo traktowane w równaniach jako substrat fizyczny limitujący wzrost. Liczba modeli opisujących wzrost mikroorganizmów jest bardzo duża. Panuje tu duży chaos i niekonsekwencja [160-183]. Praktycznie dla każdego szczepu mikroorganizmu i dla danych warunków hodowli proponuje się kolejny model [309]. Niektóre z tych modeli uwzględniają istnienie zjawiska fotoinhibicji, inne nie. W równaniach (4.2.2)-(4.2.4) i (4.2.7) w Tabeli 4.2.1 nie wzięto fotoinhibicji pod uwagę, natomiast równania (4.2.5), (4.2.6) i (4.2.8) uwzględniają to zjawisko. W równaniu (4.2.8) uwzględniono ponadto, zależność μ od średniego (I_{sr}) oraz padającego natężenia światła (I_0). Przykładowo parametry równania (4.2.10) wyznaczone dla *Spirulina* to $\mu_m=0.199 \text{ h}^{-1}$, $K_s=37.6 \text{ W/m}^2$, $I_m=150 \text{ W/m}^2$, $m=8.07 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, a maksymalna doświadczalna specyficzna szybkość wzrostu wynosiła 0.075 h^{-1} .

- Modele wielosubstratowe

Wzrost mikroorganizmów może być jednocześnie limitowany dwoma lub więcej substratami, gdy ich stężenie jest mniejsze od stężeń wysycających. Zaproponowano [15, 25, 104, 120] modele wzrostu dla dwóch substratów limitujących: interakcyjne i nieinterakcyjne. W przypadku modeli nieinterakcyjnych przyjmuje się, że szybkość wzrostu organizmu może być limitowana tylko przez jeden substrat w danej chwili. A zatem szybkość wzrostu jest równa najmniejszej szybkości przewidywanej z oddzielnego, jednosubstratowego modelu

[120]. Modele interaktywne natomiast zakładają, że jeśli dwa substraty są w stężeniach mniejszych niż stężenia wysycające, wówczas obydwa mają wpływ na całkowitą szybkość wzrostu. Najprostszy przypadek to iloczyn pojedynczych modeli jednosubstratowych. Stwierdzono, że u *Chlorella penicystis* światło, fosfor i CO₂ posiadają interakcję multiplikatywną [120].

Tabela 4.2.1

Przykładowe, literaturowe modele wzrostu zaproponowane dla mikroorganizmów

Modele wzrostu zaproponowane dla mikroorganizmów fotosyntetycznych	Modele wzrostu zaproponowane dla pozostałych mikroorganizmów
$\mu = \frac{\alpha \mu_{\max} I}{\mu_{\max} + \alpha I} \quad (4.2.2) \quad [265]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_s + S + \frac{S^2}{K_i})[1 + \frac{S}{K_v}]} \quad (4.2.11) \quad [99]$
$\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-\frac{I}{I_{\max}}}) \quad (4.2.3) \quad [277]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} S e^{(-S/K_i)}}{(K_s + S)} \quad (4.2.12) \quad [99]$
$\mu = \frac{\mu_{\max} I}{I_{\max}} e^{(1 - \frac{I}{I_{\max}})} \quad (4.2.4) \quad [258]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} e^{(-\frac{S}{K_i})}}{(K_s + S)} \quad (4.2.13) \quad [99]$
$\mu = \frac{\mu_{\max} I}{(K_i^m + I^m)^{\frac{1}{m}}} \quad (4.2.5) \quad [11]$	$\mu = \mu_{\max} [e^{(-\frac{S}{K_i})} - e^{(-\frac{S}{K_s})}] \quad (4.2.14) \quad [99]$
$\mu = \frac{\mu_{\max} I}{K_s + I + \frac{I^2}{K_i}} \quad (4.2.6) \quad [2]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_s + S + S(\frac{S}{K_i})^n)} \quad (4.2.15) \quad [99]$
$\mu = \frac{\mu_{\max} I^n}{I_k^n + I^n} \quad (4.2.7) \quad [97]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{1 + \frac{K_s}{S} + (\frac{S}{K_i})^2} \quad (4.2.16) \quad [255]$
$\mu = \frac{\mu_{\max} I_{sr}^{(b + \frac{c}{I_0})}}{[I_k(1 + (\frac{I_0}{K_i})^a)^{(b + \frac{c}{I_0})} + I_{sr}^{(b + \frac{c}{I_0})}] \quad (4.2.8) \quad [98]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} S e^{(-\frac{S}{K_i})}}{(K_s + S)} \quad (4.2.17) \quad [255]$
$\mu = \frac{\mu_{\max} S((1 + \frac{S}{K_v}))}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (4.2.9) \quad [99]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} (1 + \frac{S}{K})}{(1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i})} \quad (4.2.18) \quad [255]$
$\mu = \frac{\mu_{\max} (1 - \frac{I}{I_m})}{(1 + \frac{K_s}{I})} - m \quad (4.2.10) \quad [103]$	$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i} (1 + \frac{S}{K})} \quad (4.2.19) \quad [255]$

W przypadku gdy oba substraty spełniają równanie Monoda [15]:

$$\text{Kinetyka addytywna} \quad \mu = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\mu_{\max,i} S_i}{K_{S_i} + S_i} \right) \quad (4.2.20)$$

$$\text{Kinetyka multiplikatywna} \quad \mu = \mu_{\max} \prod_{i=1}^n \left(\frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \right) \quad (4.2.21)$$

Jeżeli niektóre substraty zostają uznane jako niezbędne a inne jedynie przyspieszają wzrost, można zmodyfikować powyższe równania. Oznaczając substraty niezbędne jako S_{ess} a te, które przyspieszają wzrost jako S_{enh} , proponuje się następujące wyrażenie:

$$\mu = (\mu_{\max,0} + \sum_{i=1}^n \frac{k_i S_{\text{enh},i}}{K_{\text{enh},i} + S_{\text{enh},i}}) \left(\prod_{j=1}^n \frac{S_{\text{ess},j}}{K_{\text{ess},j} + S_{\text{ess},j}} \right) \quad (4.2.22)$$

Pierwszy człon powyższego równania wskazuje stymulacyjny wpływ substratu przyspieszającego wzrost, podczas gdy drugi człon dotyczy substratu niezbędnego do wzrostu. Symbol $\mu_{\max,0}$ określa maksymalną specyficzną szybkość wzrostu przy nieobecności substratów przyspieszających wzrost [120].

- Model hodowli miksotroficznej

Hodowla miksotroficzna to proces limitowany podwójnie: przy niskim natężeniu światła i/lub niskim stężeniu organicznego źródła węgla wzrost jest limitowany, przy wysokim natężeniu światła i/lub wysokim stężeniu substratu organicznego, wzrost komórek może być inhibowany [25-28, 314-316]. Zhang [316] określił wzrost w hodowli miksotroficznej kinetyką multiplikatywną. Zarówno do opisu wpływu natężenia światła, jak i stężenia glukozy na specyficzną szybkość wzrostu wykorzystał równanie (4.2.6). Wyznaczono parametry modelowe dla światła: $\mu_{\max}=0.0919 \text{ h}^{-1}$, $K_S=3.02 \text{ klx}$, $K_I=2.34 \text{ klx}$ oraz dla glukozy: $\mu_{\max}=0.142 \text{ h}^{-1}$, $K_S=3.68 \text{ g/dm}^3$, $K_I=1.24 \text{ g/dm}^3$. W literaturze fachowej nie znaleziono przykładu modelowania wzrostu miksotroficznego *Spirulina*, podczas gdy zależność $\mu(I)$ autotrofów oraz $\mu(C_{\text{Gl}})$ heterotrofów jest szeroko dyskutowana. Marquez [179-182] wnioskował, że miksotrofia jest prostą superpozycją auto- i heterotrofii ($M=A+H$), ale nie badał wpływu natężenia światła na μ . Według niego fotosynteza i utlenianie glukozy funkcjonują jednocześnie. Poczynił [179] wstępne próby łącząc ΔX_M z ΔX_A współczynnikiem proporcjonalności α . Założył, że $\Delta X_M = \Delta X_A + \Delta X_H$, $\Delta X_H = \alpha \Delta X_M$, $\Delta X_M = \Delta X_A / (1 - \alpha)$. Nie dyskutuje jednak zależności α od I .

Jedynie Chen [27] i Vonshak [292] badali wpływ I na μ_M . W publikacji Vonshak'a badany zakres natężenia światła wydaje się być niepełny, natomiast doświadczenia Chen'a [27] wskazują na wystąpienie efektu fotoinhibicji przy zaskakująco niskich I (16 W/m^2) -

trudno zgodzić się z autorem, że przy tak niskich natężeniach światła, w porównaniu do I światła słonecznego ($150-500 \text{ W/m}^2$) występuje efekt fotoinhibicji. Być może jest to związane z nieścisłością pomiaru I . Z porównania wpływu natężenia światła na specyficzną szybkość wzrostu, hodowla miksotroficzna wykazuje 20-40 % wyższe μ niż autotroficzna przy każdym natężeniu światła [294]. Inhibujący wpływ światła jest obserwowany przy natężeniu $I=38.4 \text{ W/m}^2$ i jest wyższy w hodowli miksotroficznej niż autotroficznej.

4.3 Fotobioreaktory

W przeszłości *Spirulina* hodowano w otwartych zbiornikach, obecnie proponuje się wykorzystanie fotobioreaktorów (reaktory do hodowli mikroorganizmów fotosyntetycznych) [26]. Zamknięte układy fotobioreaktorów są najczęściej sztucznie naświetlane, dodawany jest CO_2 , są mieszane, istnieje możliwość utrzymania stałej temperatury. Zalety w stosunku do stawów hodowlanych, gdzie panują warunki klimatyczne to: lepsza kontrola środowiska hodowlanego, większa wartość stosunku powierzchnia/objętość, lepsza kontrola transportu gazów, lepsze zabezpieczenie przed zanieczyszczeniami zewnętrznymi, wyższa produktywność biomasy [25-28, 114, 188]. Wady to przede wszystkim większe nakłady inwestycyjne i operacyjne [48, 103].

Fotobioreaktory to iluminowane reaktory [154]. Najczęściej stosuje się fotobioreaktory rurowe lub płaskie. Różnią się między sobą orientacją rur lub paneli, mechanizmem cyrkulacji hodowli, metodą dostarczania światła, systemem wymiany gazowej, układem indywidualnych węzłów wzrostowych, materiałami konstrukcyjnymi [16, 17]. Przy doborze fotobioreaktora konieczne jest zapewnienie [98] efektywnego i wydajnego rozchodzenia światła, dostarczanie dwutlenku węgla z jednoczesnymi niskimi stratami, możliwość usuwania tlenu powstałego na drodze fotosyntezy, możliwość przeniesienia skali [189, 216, 271].

Produktywność biomasy zależy od doboru odpowiedniego środowiska wzrostu dla danego szczepu alg. Podczas gdy kontrola składu pożywki nie sprawia trudności, kontrola dostępu i rozchodzenia się światła w fotobioreaktorze jest złożonym problemem. W gęstych hodowlach mikroalg penetracja światła jest gorsza ze względu na efekt samo-zacieniania i absorpcji światła. W reaktorze znajdują się strefy zmiennego naświetlenia o różnej objętości, czyli o różnym czasie przebywania komórki w danej strefie [21, 98, 293, 299].

Najprostszym rozwiązaniem z punktu widzenia opisu modelowego rozchodzenia się światła w reaktorze jest prostopadłościenny fotobioreaktor naświetlany w sposób jednorodny z dwóch stron. Umożliwia to uniknięcie zmienności natężenia światła wewnątrz reaktora

[155]. W takim przypadku wyznaczenie średniego natężenia światła (I_{sr}) nie stwarza trudności. Do opisu zmienności natężenia światła z pozycją w reaktorze z uwzględnieniem stężenia komórek stosuje się prawo Lamberta-Beera [50].

4.4 Technologia produkcji mikroalg oraz ich biotechnologia środowiskowa

4.4.1 Produkcja masowa biomasy mikroalg - aspekty technologiczne

Ze wszystkich opisanych 30000 szczepów mikroalg, jedynie 8 jest hodowanych w skali przemysłowej: *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phaeodactylum*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella*, *Porphyridium* [226, 298]. Przemysłowa produkcja biomasy *Spirulina* jako dodatku do żywności rozpoczęła się pod koniec lat 70-tych XX w. [144]. Wówczas roczna produkcja biomasy *Spirulina* sięgała 100-400 ton, 25 lat później 1000 ton, a w chwili obecnej 3000 ton [270]. W latach 90-tych hodowla przemysłowa *Spirulina* prowadzona była w 20 krajach, m.in. w Chinach [118] przy wydajności wzrostu 40 g/(m²d) [118]. Obecnie, kraje w których mikroalgi są produkowane w skali przemysłowej to m.in. Meksyk, Japonia, Tajwan, Izrael, Stany Zjednoczone, Indie, Australia i Peru [123], a zatem produkcja jest prowadzona w krajach leżących na wysokości geograficznej pomiędzy 40 °N i 40 °S.

Spirulina przez długi okres czasu była hodowana w skali przemysłowej na sposób fotoautotroficzny w otwartych basenach, w których końcowe stężenie komórek było niskie (typowo 0,4-0,6 g/dm³) [225]. Hodowla przebiegała najczęściej w płytkich, otwartych stawach, aby energia słoneczna absorbowana przez cyjanobakterie mogła być wykorzystywana do wiązania nieorganicznego źródła węgla. Niskie stężenie biomasy, wymagało zastosowania systemów hodowlanych o dużych gabarytach. Hodowla *Spirulina* w warunkach heterotroficznych i miksotroficznych mogłaby potencjalnie doprowadzić do zwiększenia stężenia biomasy, a tym samym zmniejszenia instalacji produkcyjnej. Wzrost taki może się okazać atrakcyjny ekonomicznie w najbliższej przyszłości [27, 179].

Hodowla mikroalg jest stosunkowo trudna. Główne problemy związane są przede wszystkim z wysokimi kosztami produkcji, szczególnie w przypadku wykorzystania alg do celów spożywczych, nawozów lub pasz. Nie dotyczy to jednak wszystkich gatunków. Produkcja na skalę masową w celu otrzymania chemikaliów i biochemikaliów, takich jak fikobiliproteiny, jest uznawana za lukratywną inwestycję [145]. Wysoko opłacalna jest również produkcja tzw. zdrowej żywności opartej o biomasę mikroalg (np. *Spirulina* z jeziora

Texcoco w Meksyku) [226]. Hodowla mikroalg o niskim stopniu czystości nie jest kosztowna.

- Czynniki środowiskowe oddziałujące na masową produkcję mikroalg

Większość hodowli masowych odbywa się w naturalnych warunkach nasłonecznienia i temperatury jakie panują w miejscu hodowli [226, 290]. Komórki podlegają zatem dobowym cyklom świetlnym oraz termicznym.

Hodowany szczep powinien charakteryzować się wysoką stałą wysycania światłem, niską szybkością procesów niszczących (oddychanie, wydzielanie substancji egzokomórkowych, wysoką opornością na fotoutlenianie i fotoinhibicję i in.) oraz wysoką wytrzymałością na stres fizyczny związany z występowaniem gwałtownych turbulencji. Aby obniżyć koszty procesu można np. wykorzystać wyhodowaną biomasę do produkcji chemikaliów, a następnie zastosować jako biosorbent [270].

4.4.2 Próby zwiększenia produktywności biomasy

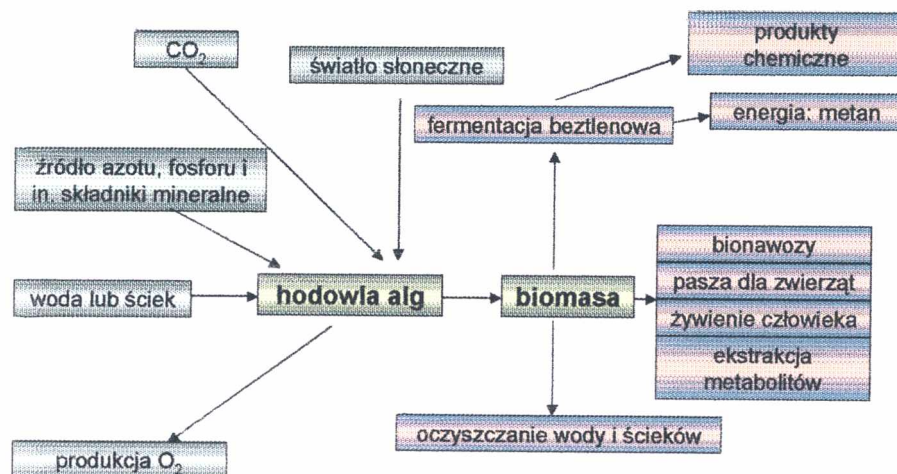
Cechą charakterystyczną mikroalg fotosyntetycznych jest niska specyficzna szybkość wzrostu [63, 212]. W literaturze podjęto próby rozpoznania czynników stymulujących wzrost, poprzez dodanie:

czynnik zwiększający produktywność biomasy	opis
glukoza - wzrost miksotroficzny w hodowli okresowej	Prowadzono hodowlę <i>Spirulina</i> na sposób miksotroficzny na glukozie, przy dostępie światła [179]. W warunkach limitowanych światłem zaobserwowano zwiększoną produktywność biomasy dzięki udziałowi heterotroficznego metabolizmu glukozy. Produkcję biomasy zwiększono 1,5-2,0-krotnie w porównaniu do wzrostu autotroficznego [179].
glukoza - wzrost miksotroficzny w hodowli półokresowej	W miksotroficznej hodowli półokresowej [28] uzyskano pięciokrotny wzrost stężenia komórek w porównaniu do hodowli fotoautotroficznej. W hodowli fotoautotroficznej specyficzna szybkość wzrostu jest bardzo niska $0,0083 \text{ h}^{-1}$. W hodowli miksotroficznej osiąga wartość $0,026 \text{ h}^{-1}$. Hodowla miksotroficzna jest procesem limitowanym przez dwa substraty, w którym przy niskim natężeniu światła lub niskim stężeniu substratu heterotroficzny wzrost komórek może być zahamowany. Zaletą hodowli półokresowej jest utrzymanie stałego, stężenia substratu organicznego (w tym przypadku glukozy) i zapobieganie efektowi inhibicji substratowej [25].
odpady i ścieki, np. gnojowica	Odpady pochodzące z hodowli świń wg Canizares i in. [20] po stabilizacji poprzez napowietrzanie lub trawienie beztlenowe mogą zostać wykorzystane jako substrat do wzrostu mikroalg. Olguin i in. [202, 203] wykorzystali jako tanią pożywkę, wodę morską wzbogaconą w gnojowicę z hodowli trzody chlewnej, oraz wodorowęglan sodu. Zaobserwowano usunięcie toksycznych składników przez <i>Spirulina</i> oraz zadowalający przyrost biomasy.
hydrolizat zbożowy lub ekstrakt z pulpy papierniczej	Dodanie ekstraktu z eukaliptusowej pulpy celulozowej [24] powoduje zwiększenie szybkości wzrostu o 38 %, a współczynnika wydajności biomasy o 43 %. Singh i in. [77] wykorzystali hydrolizat zbożowy jako dodatek powodujący zwiększenie przyrostu biomasy uzyskując 40 % większą produktywność [253].

4.4.3 Zastosowanie mikroalg w biotechnologii środowiskowej

Terminem „biotechnologia alg” określono wykorzystanie procesu fotosyntezy w namnażaniu biomasy w celu wyprodukowania żywności, paszy, chemikaliów, energii czy

biosorbentów [294]. Mikroalgi są produkowane w skali technologicznej m.in.: w instalacjach produkujących paszę dla zwierząt stosowane jednocześnie do oczyszczania ścieków, do produkcji odczynników chemicznych oraz biochemicznych, w produkcji nawozów oraz żywności (Rys. 4.4.1). Przy projektowaniu technologii produkcji biomasy mikroalg należy uwzględnić interakcje czynników środowiskowych, takich jak światło, obecność substratu organicznego, temperatura, zasolenie, poziom składników pokarmowych, pH, fotoinhibicję, fotooddychanie [294].



Przykładowy schemat biotechnologii produkcji mikroalg

Rys. 4.4.1

Przykładowy schemat biotechnologii produkcji mikroalg [294]

Mikroorganizmy fotosyntetyczne w biotechnologii środowiskowej znajdują zastosowanie w:

Produkcja biopaliw i biopoliestrów przez beztlenowe bakterie fototroficzne [240]

Oczyszczanie ścieków z przemysłu wytwarzającego gumę w systemie stawów HRAP - High Rate Algal Ponds [211],

Usuwanie gazów cieplarnianych - CO₂ i NO_x [190],

Usuwanie metali ciężkich - biosorpcja i bioakumulacja [92, 112],

Biodegradacja i biotransformacja węglowodorów oleistych; Mikroalgi posiadają aparat enzymatyczny umożliwiającą transformację i bioakumulację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych do prostszych związków [163],

Oczyszczanie gleby [131],

Produkcja odnawialnych biopaliw (etanol, B'diol) i związków chemicznych [146].

W ciągu ostatnich kilku lat wzrosło zainteresowanie algami ze względu na ich zdolności biosorpcyjne. Istnieją konkretne przykłady zastosowań tego typu produktów. Niedawno powstała, amerykańska firma *Biorecovery Systems of las Cruces* z Nowego Meksyku, która opatentowała serię produktów na bazie alg marki AlgaSORB[®], które znalazły zastosowanie do odzysku jonów metali ze ścieków przemysłowych. Są to nieżyjące, żywico-podobne preparaty z mikroalg *Chlorella*, *Spirulina* oraz alg morskich [19], jednak ich zasada działania nie została wyjaśniona.

II.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

5. CEL I ZAKRES PRACY

5.1 Cel pracy

Celem badań jest opracowanie koncepcji, której efektem powinien być sposób usuwania jonów metali ciężkich. W tym celu zostaną określone możliwości wykorzystania mikroalg *Spirulina sp.* do usuwania jonów metali ciężkich, z roztworów o niskim ładunku zanieczyszczeń, w procesach biosorpcji oraz bioakumulacji. Zostaną przeprowadzone badania podstawowe na roztworach modelowych, obejmujące wiązanie jonów metali ciężkich do powierzchni komórek (na przykładzie jonów Cr^{3+} , Cd^{2+} oraz Cu^{2+}) oraz akumulacji w ich wnętrzu (na przykładzie Cr^{3+}). Zarówno proces biosorpcji jak i bioakumulacji wymaga przeprowadzenia badań nad hodowlą biomasy. W pracy podjęta zostanie próba wyjaśnienia mechanizmu każdego z zachodzących procesów. Będzie to stanowić podstawę do zaproponowania opisu ilościowego przyrostu biomasy oraz równowag biosorbent-jon i bioakumulant-jon, co umożliwi określenie warunków prowadzenia procesów.

W literaturze poświęcono dużo uwagi poszukiwaniu nowych metod, wydajnych w oczyszczaniu ścieków z jonów metali ciężkich o małym stopniu zanieczyszczenia, w szczególności metod mikrobiologicznych oczyszczania ścieków, wśród których rozróżnia się dwa procesy o różnej naturze: biosorpcję (proces szybki, o charakterze fizykochemicznym, zachodzący na powierzchni komórki i związany z charakterem ściany komórkowej) i bioakumulację (związaną ze wzrostem mikroorganizmu w środowisku zawierającym jony metali ciężkich z jednoczesną akumulacją wewnątrz komórki).

Przy rozważaniu tych procesów niezwykle istotny jest dobór odpowiedniego szczepu (biosorbenta, bioakumulanta), który będzie posiadać wysoką pojemność wiązania jonów metali ciężkich. W przypadku bioakumulacji dodatkowo konieczne jest aby wykorzystywany organizm posiadał niewielkie wymagania pokarmowe oraz był odporny na obecność zanieczyszczeń. Szczep powinien posiadać elastyczny metabolizm, który pozwoli na przystosowanie do warunków i składu oczyszczanego ścieku. Dodatkowo, organizm ten nie powinien być toksyczny czy niebezpieczny dla ekosystemów.

Kryteria takie spełniają mikroalgi *Spirulina sp.*, które dzięki metabolizmowi miksotroficznemu (w zależności od składu ścieku prowadzą fotosyntezę, tlenowy rozkład glukozy, lub obydwa te procesy jednocześnie) mogą rosnąć w ściekach o różnym składzie i

stopniu zanieczyszczenia, a na podstawie wcześniejszych badań [40] organizmy te posiadają zarówno wysoką pojemność biosorpcyjną jak i bioakumulacyjną.

5.2 Zakres pracy

W pracy proponuje się sposób wykorzystania mikroalg *Spirulina sp.* - mikroorganizmów miksotroficznych, o elastycznym metabolizmie, odpornych na wysokie stężenia zanieczyszczeń. Głównymi zaletami takiego rozwiązania są wysokie zdolności biosorpcyjne i bioakumulacyjne oraz niska toksyczność jonów metali ciężkich dla tych organizmów.

W przypadku metody opartej o biosorpcję, proces oczyszczania korzystne jest rozdzielenie na dwa autonomiczne węzły: hodowlę biomasy i biosorpcję, natomiast w przypadku bioakumulacji biomasa jest hodowana w obecności zanieczyszczeń z jednoczesnym wiązaniem jonów metali ciężkich z roztworu. Prowadzenie procesu w dwóch autonomicznych węzłach umożliwia dobór parametrów procesowych, które są inne dla hodowli komórek, a inne dla biosorpcji.

Prace nad hodowlą biomasy powinny nie tylko określić szybkość wzrostu i stopień wykorzystania substratów, ale również jakość biomasy. Warunki namnażania biomasy powinny mieć wpływ na skład ściany komórkowej, do której wiązane są jony metalu, czyli powinny mieć wpływ na pojemność biosorpcyjną.

Praca zostanie podzielona na cztery części:

- I. HODOWLA BIOMASY
- II. BIOSORPCJA
- III. BIOAKUMULACJA
- IV. OCZYSZCZANIE ŚCIEKÓW

I. Hodowla biomasy

Pierwsza część pracy, będzie poświęcona hodowli biomasy obejmuje badania nad doborem warunków wzrostowych mikroalg, w szczególności natężenia światła i stężenia glukozy, określeniem natury i mechanizmu każdego metabolizmu: autotrofii, heterotrofii i miksotrofii, wyznaczeniem parametrów kinetycznych oraz statycznych wzrostu oraz opracowaniem modelu matematycznego i konfiguracją systemu, który umożliwiłby hodowlę komórek w wysokich stężeniach.

II. Biosorpcja

Druga część pracy będzie poświęcona biosorpcji, która jest procesem szybkim, zależnym głównie od stężenia komórek i ich jakości oraz stężenia początkowego metalu w

ściekach. W celu doboru warunków dla procesu biosorpcji, zostaną przeprowadzone prace nad: mechanizmem procesu, określeniem wpływu parametrów procesowych na wydajność biosorpcji (stężenie metalu, stężenie komórek, temperatura, czas kontaktu, pH, wpływem warunków prowadzenia hodowli na zdolność biomasy do wiązania jonów metalu (jakość biomasy, czyli pojemność biosorpcyjna)), możliwościami odzysku metalu związanego z biomasa.

III. Bioakumulacja

W trzeciej części pracy zostanie podjęta próba wyjaśnienia podstaw procesu bioakumulacji. Zostaną przeprowadzone badania nad: wpływem obecności jonów metali ciężkich na parametry kinetyczne oraz statyczne wzrostu mikroalg, mechanizmem procesu bioakumulacji, denitryfikacją towarzyszącą bioakumulacji, propozycją opisu matematycznego procesu w oparciu o jego mechanizm.

IV. Oczyszczanie ścieków

W czwartej części pracy zostanie przeprowadzone oczyszczanie konkretnych ścieków przemysłowych z jonów metali ciężkich oraz jonów amonowych z zastosowaniem *Spirulina sp.* w procesie bioakumulacji.

5. 3 Opis ogólny tematu

Precyzyjne określenie stopnia usunięcia jonów metali ciężkich z roztworów o niskim stężeniu uzyskano dzięki zastosowaniu nowoczesnej aparatury analitycznej spektrometrów ICP-AES oraz ICP-MS. Zaawansowane techniki analityczne wykorzystano również do oceny biomasy. Skład komórek zostanie oznaczony analizatorem elementarnym CHONS, natomiast wartość opałową aparatem do analizy TG/DTA. Pozostałe oznaczenia zostaną przeprowadzone elektrodami oraz technikami spektrofotometrycznymi.

Hodowla biomasy

Prace nad hodowlą biomasy będą obejmować:

- okresowe autotroficzne, heterotroficzne i miksotroficzne hodowle mikroalg *Spirulina sp.* w sztucznie naświetlanym fotobioreaktorze mieszalnikowym (natężenie światła 0-65 W/m², stężenie glukozy 0-10 g/dm³)
- podczas hodowli monitorowano stężenie glukozy, azotu-azotanowego oraz natężenie światła
- wyznaczenie specyficznych szybkości wzrostu

- opracowanie empirycznych modelei matematycznych szybkości wzrostu w funkcji natężenia światła (dla hodowli autotroficznej), stężenia glukozy (dla hodowli heterotroficznej) oraz natężenia światła i stężenia glukozy (dla hodowli miksotroficznej)
- określenie odpowiedniego do namnażania hodowli wartości parametrów: natężenia światła oraz stężenia glukozy
- przeprowadzenie analizy wydajności wykorzystania substratów określając współczynniki wydajności biomasy, $Y_{X/S}$ oraz wydajność wykorzystania substratów energetycznych, Y_{kJ}

Biosorpcja

Prace nad biosorpcją jonów metali ciężkich będą obejmować:

- doświadczenia dla trzech kationów Cr^{3+} , Cd^{2+} oraz Cu^{2+} uważanych za poważne zanieczyszczenia wód i ścieków.
- określenie kinetyki wiązania jonów metali do powierzchni biomasy (proces opisano jako reakcję równowagową, pierwszorzędową)
- określenie pojemności biosorpcyjnej jonów metali ciężkich przez poszczególne formy morfologiczne *Spirulina sp.* i opisanie równowagi procesu odpowiednim równaniem izotermy (Langmuira)
- określenie mechanizmu biosorpcji - rozważano dwie możliwości: adsorpcję fizyczną oraz wymianę jonową; stwierdzono znaczący udział wymiany jonowej
- określenie pojemności kationowymiennej biomasy, zidentyfikowano trzy grupy funkcyjne biorące udział w wymianie kationów, określenie stałych dysocjacji kwasowej oraz stałych wiązania grup z kationami metalu; charakter chemiczny grup zostanie potwierdzona ich chemiczną modyfikacją
- zaproponowanie metody odzysku związanego z biomasą metalu poprzez elucję słabym kwasem lub spalenie biomasy
- określenie wpływu parametrów hodowli (natężenie światła, stężenie glukozy) na pojemność biosorpcyjną biomasy

Bioakumulacja

Prace nad bioakumulacją jonów metali ciężkich będą obejmować:

- hodowlę okresową komórek w obecności jonów Cr^{3+} w stężeniu 3-26 mg/kg
- badanie toksycznego wpływu jonów na komórki oraz rozpoznanie możliwości ich usuwania
- określenie tolerancji komórek w stosunku do jonów metali ciężkich jako funkcję specyficznej szybkości wzrostu oraz współczynników wydajności biomasy względem substratów

- prace zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu procesu - zaobserwowano dwa etapy: pasywny (wiązanie do powierzchni komórki) i aktywny (wprowadzanie jonów do wnętrza komórki)
- zaproponowanie modelu matematycznego do opisu zmian stężenia jonów metalu w czasie w zależności od początkowego stężenia jonów metalu.

Oczyszczanie ścieków

Prace nad oczyszczaniem ścieków będą obejmować:

- proces bioakumulacji oczyszczania przykładowych ścieków przemysłowych o niskim stężeniu zanieczyszczeń, nie zawierający organicznego źródła węgla, bez wzbogacania w składniki pokarmowe
- dyskusję nad rozwiązaniami technologicznymi.

6. MATERIAŁY I METODY

6.1 Odczynniki

kw. 3,5-dinitrosalicylowy, ALDRICH Chemical Company, Inc.

HCl, HNO₃ - spektralnie czysty, MERCK

Spirulina sp. (SIGMA-USA)

pozostałe odczynniki POCh Gliwice

6.2 Aparatura

Fotobioreaktor

Reaktor skonstruowany we własnym zakresie

Luksomierz

Luksomierz PU 550 Metro Blansko, Czechy

Spektrofotometr

spektrofotometr UV-160A, UV-VIS Shimadzu, Japonia

pH-metr oraz elektrody

pH-metr z jonometrem MA235 Mettler-Toledo, Szwajcaria

- pH - polimerowa elektroda pH kombinowana z sondą temperatury, typ Inlab 415

- CO₂ - elektroda gazowa GSE CO₂ Mettler-Toledo typ 152323000

- NO₃⁻ - jonoselektywna elektroda azotanowa (Mettler-Toledo) typ 152223000. z elektrodą odniesienia (Mettler-Toledo) typ Inlab 302: 373-90WTE-ISE-S7 wypełnioną elektrolitem Ag/AgCl

- O₂ - czujnik tlenowy firmy Mettler-Toledo MO128

Termostat

Fisherbrand FBH 612, Niemcy

Fotobioreaktor do hodowli *Spirulina sp.*

Mikroalgi hodowano w sztucznie naświetlanym, termostatowanym prostopadłościennym fotobioreaktorze mieszalnikowym (Rys. 6.2.1). Dwie największe, naprzeciwległe ściany reaktora wykonano ze szkła. Dwie mniejsze (wykonane z mosiądzu) stanowiły płaszcz termostatujący reaktora. Reaktor naświetlano przez szklane ścianki z dwóch stron przy pomocy 4 lamp fluorescencyjnych (moc 4 W, firmy Starlicht) z każdej strony. Wymiary: 0.15 m · 0.0525 m · 0.20 m. Całkowita objętość reaktora: 1.6 dm³. Droga penetracji światła 0.0525 m. Objętość robocza 1.0 dm³ (przy wypełnieniu 0.128 m). Krótka droga penetracji światła zapewniła jego w miarę jednorodne natężenie w reaktorze: natężenie światła w środkowym przekroju reaktora było ok. 13 % niższe niż przy naświetlanych ściankach. Konstrukcja reaktora zapewniła możliwość 8-stopniowej regulacji natężenia światła zakresie 0-65 W/m².

Sterylizator parowy

ASVE, Spółdzielnia Mechaników SMS, Polska

Lampa UV

do sterylizacji powierzchni i reaktora - Philips 30W/G30 T8

Wirówka

Hettich EBAIII, Niemcy

Redestylator

Polna S.A., typ Rel 5, Polska

Pompka napowietrzająca

Tetratec AP100, Polska

Analiza stężenia pierwiastków

Spektrometr plazmowy ICP-AES (Philips Scientific PU 7000, Wielka Brytania) oraz ICP-MS (Varian UltraMass 700, Australia).

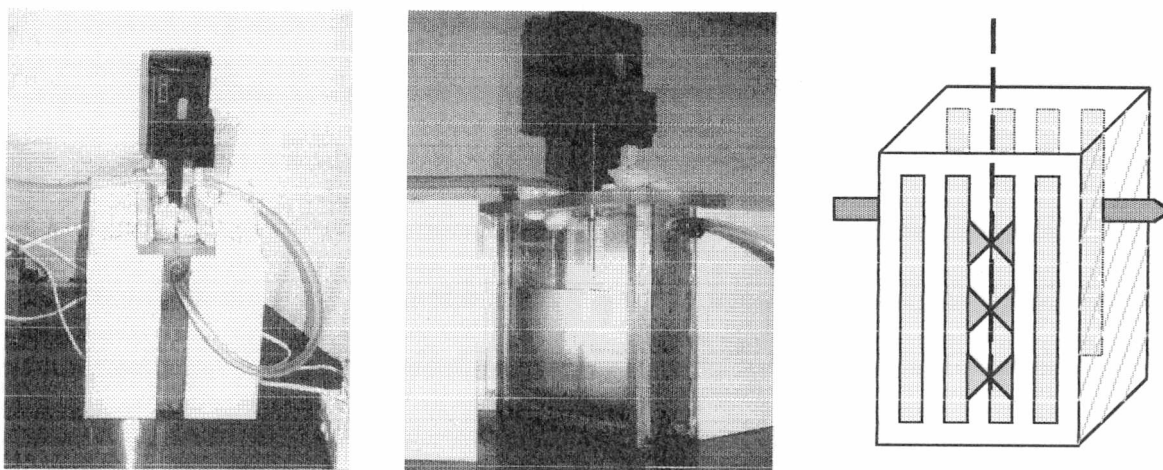
Analiza składu komórek

Eurovector Elemental Analyser EA 3000 (C,H,O,N,S), Włochy

Analiza wartości opałowej

Netzsch STA 409C, Niemcy

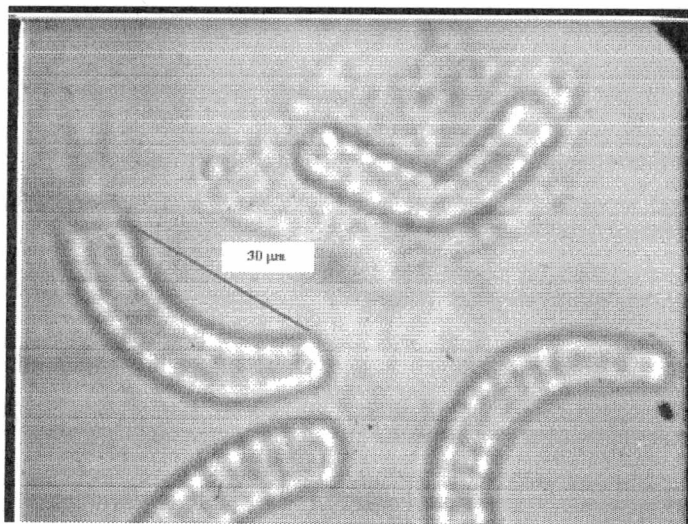
Powietrze doprowadzano pompką (przepływ $4 \text{ cm}^3/\text{s}$), zaopatrzoną w filtr sterylizujący powietrze ($0.45 \text{ }\mu\text{m}$ Whatman PVDF). Odpowiednie przemieszanie zapewniło mieszadło z regulowaną częstością obrotów, trójpoziomowe, łopatkowe. Napowietrzanie wspomagało mieszanie hodowli. W pokrywie reaktora znajdowały się króćce, umożliwiające pobieranie próbek (sterylnymi pipetami).



Rys. 6.2.1
Fotobioreaktor do hodowli *Spirulina sp.*

6.3 Materiał badawczy

Szczep do badań pochodził z firmy SIGMA (USA): *Spirulina sp.* (mixed species): *Spirulina platensis* i *Spirulina maxima*, preparat przemity i liofilizowany, wrażliwy na działanie światła.



Rys. 6.3.1
Zdjęcie mikroskopowe komórek *Spirulina sp.*

6.4 Pożywka hodowlana

Hodowle mikroorganizmu prowadzono na pożywce płynnej typu Zarrouk^{*)} [312]:

związek	stężenie [g/dm ³]
NaNO ₃	2.50
KH ₂ PO ₄	0.50
NaHCO ₃	10.0
NaCl	1.00
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.80
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.02
FeSO ₄	0.01
MnCl ₂	0.01
Glukoza	0.00-10.00

Składniki pożywki (z wyjątkiem NaHCO₃ oraz FeSO₄) rozpuszczano i sterylizowano.

Po sterylizacji dodawano NaHCO₃ oraz FeSO₄. Procedura taka była konieczna, ponieważ dodanie tych związków przed sterylizacją spowodowałoby zmętnienie pożywki - strącenie składników oraz straty CO₂.

6.5 Sterylizacja

Pożywki, szkło laboratoryjne i węże sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C w czasie 15 minut pod ciśnieniem 1.5 MPa. Reaktor dezynfekowano przemywając 95 % alkoholem etylowym, a następnie naświetlano lampą UV przez 2 h.

6.6 Inoculum

Inoculum stanowił liofilizowany proszek *Spirulina sp.*, który naważano tak, by stężenie inoculum wynosiło 0.25 g/dm³. Liofilizat zawiera formy przetrwalnikowe *Spirulina platensis* oraz *S. maxima*, które podlegają reaktywacji w momencie kontaktu z pożywką. Stosowanie każdorazowo tego samego liofilizowanego inoculum (bez konieczności podtrzymywania form żywych) wyeliminowało zmienność (spowodowaną selekcją) i zapewniło wysoką powtarzalność prowadzonych hodowli.

6.7 Hodowla biomasy

Przeprowadzono hodowle auto-, hetero- oraz miksotroficzne: okresowe w reaktorze.

Hodowla autotroficzna

Spirulina sp., cyjanobakterię, hodowano w fotobioreaktorze (hodowla okresowa) przy różnym średnim natężeniu światła (w zakresie 8-65 W/m², fotoperiod 12:12), w temperaturze 35°C na minimalnej, mineralnej pożywce typu Zarrouk [312] bez glukozy.

Próby do badań pobierano w określonych odstępach czasu i mierzono w nich stężenie komórek przez pomiar zmętnienia płynu hodowlanego przy $\lambda=560$ nm. Następnie pobrane próbki wirowano przy 6000 obr./min. w czasie 5 minut. Uzyskany supernatant wykorzystano do dalszych oznaczeń: pH, azotanów, CO_2 .

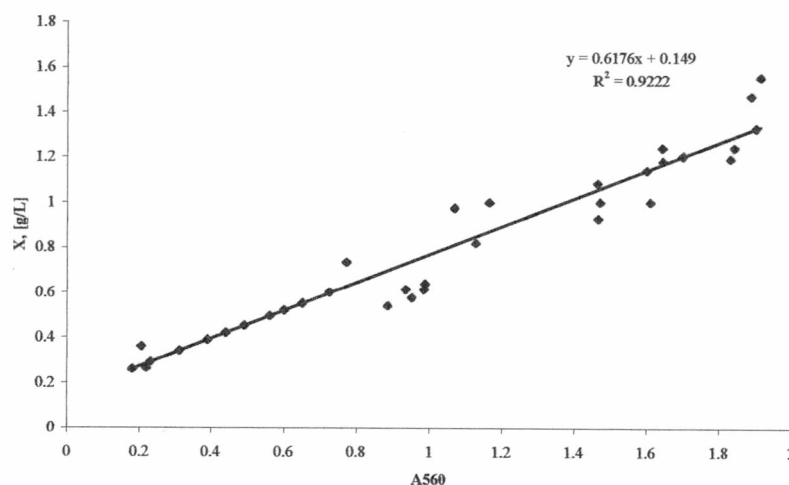
Hodowla heterotroficzna i miksotroficzna

Spirulina sp., hodowano w fotobioreaktorze przy różnym natężeniu światła (miksotroficzna: w zakresie 8-65 W/m^2 , fotoperiod 12:12, heterotroficzna: 0 W/m^2), w temperaturze 35°C na minimalnej, mineralnej pożywce typu Zarrouk z dodatkiem glukozy (0.1-10 g/dm^3).

6.8 Metody analityczne

– Stężenie komórek

Pomiar stężenia komórek oznaczano spektrofotometrycznie (pomiar absorbancji przy $\lambda=560$ nm) bez odnośnika. Pomiar absorbancji wycechowano na suchą masę. Odwirowano 20 cm^3 zawiesiny komórek w uprzednio wysuszonej w temperaturze 80 °C do stałej masy próbki wirówkowej. Biomase suszono do stałej masy w temperaturze 80 °C, a następnie ważono. Obliczono suchą masę i sporządzono krzywą wzorcową, umożliwiającą przeliczenie mierzonej absorbancji przy $\lambda=560$ nm na stężenie suchej masy komórek (Rys. 6.8.1). Prosta ta nie przecina się w (0, 0), ponieważ pomiar przeprowadzano bez odnośnika.



Rys. 6.8.1

Krzywa wzorcową określającą zależność pomiędzy absorbancją mierzoną przy $\lambda=560$ nm (A_{560}) a stężeniem suchej masy komórek (X)

– *pH*

pH mierzono pH-metrem z polimerową kombinowaną elektrodą pH z sondą temperatury. Stosowano każdorazowo kalibrację 3-punktową (bufory kalibracyjne Mettler-Toledo pH 7.000, 4.010, 9.210).

– *CO₂*

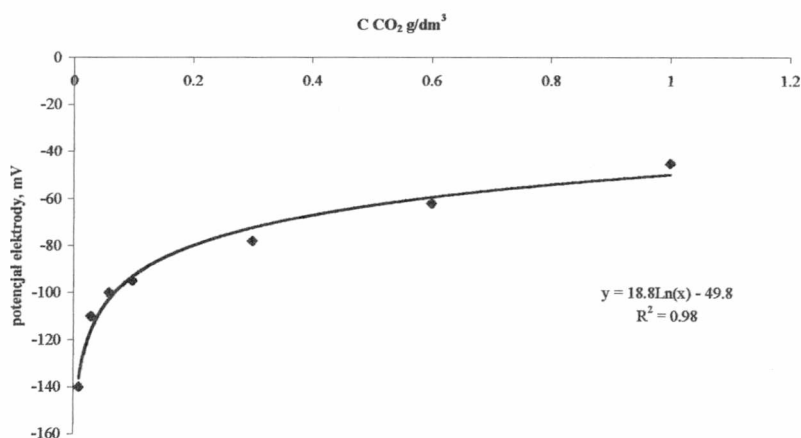
CO₂ mierzono elektrodą gazową, która umożliwia pomiar CO₂ w układach wodnych. Pomiary dokonywano wobec roztworu kondycjonującego, którego zadaniem było przeprowadzenie wszystkich form CO₂ (węglanowych, wodorowęglanowych) do gazowego CO₂, którego stężenie mierzono selektywną elektrodą gazową.

Roztwór kondycjonujący przygotowano w następujący sposób:

294 g cytrynianu sodu $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ rozpuszczono w ok. 600 cm³ wody, dodano 100 cm³ stężonego 32 % kwasu solnego i uzupełniono wodą do objętości 1000 cm³.

Sposób wykonania pomiarów:

Do 5 cm³ próbki dodano 0.5 cm³ roztworu kondycjonującego i natychmiast odczytano potencjał elektrody. Przykładową krzywą wzorcową przedstawiono na Rys. 6.8.2.



Rys. 6.8.2
Krzywa kalibracyjna elektrody CO₂

– *O₂*

Rozpuszczony tlen mierzono czujnikiem tlenowym, skonstruowanym z katody zbudowanej z metalu szlachetnego oraz srebrnej anody. Elektrody, połączone kluczem elektrolitycznym (roztwór chlorku potasu), oddzielonym od próbki membraną gazoprzepuszczalną. Sonda tlenowa posiada czujnik temperaturowy, kompensujący zmiany ciśnienia parcjalego spowodowane zmianami temperatury. Pierwszym etapem pomiaru jest dyfuzja tlenu przez membranę, kolejnym - redukcja na katodzie dzięki przyłożonemu napięciu. Rezultatem jest przepływ prądu, proporcjonalny do ciśnienia parcjalego tlenu,

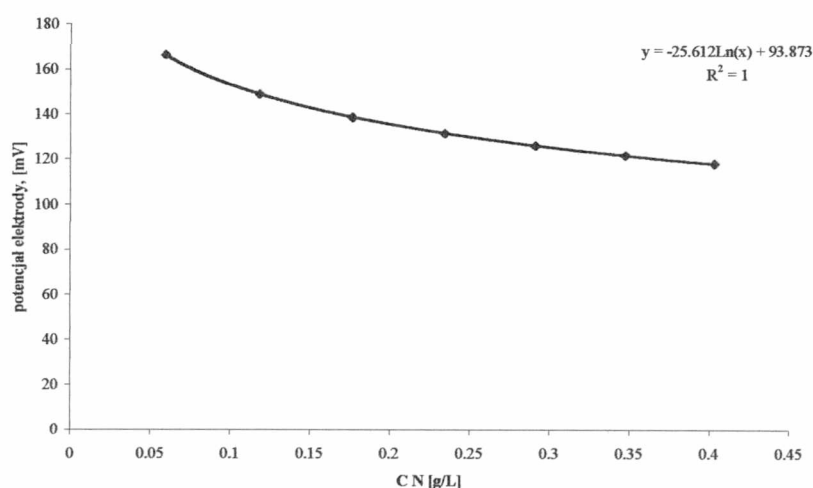
które z kolei jest proporcjonalne do stężenia tlenu, mierzonego przez czujnik jako % wysycenia tlenem lub jest przeliczany na $[\text{mg O}_2/\text{dm}^3]$. Przed pomiarem przeprowadzano 2-punktową kalibrację.

– Azot azotanowy

Stężenie azotu azotanowego oznaczano jonoselektywną elektrodą azotanową z elektrodą odniesienia.

Pomiar przeprowadzano w sposób następujący:

do 50 cm^3 wody dodano 1 cm^3 ISA (roztwór niwelujący wpływ siły jonowej) ($0.9 \text{ mol/dm}^3 \text{ Al}_2(\text{SO}_4)_3$) a następnie 0.5 cm^3 kolejnej próbki (analiza różnicowa). Przykładową krzywą wzorcową przedstawiono na Rys. 6.8.3.



Rys. 6.8.3
Krzywa kalibracyjna elektrody azotanowej

– Glukoza

Glukozę oznaczono metodą kolorymetryczną w udziale kwasu dinitrosalicylowego (metoda DNS). Metoda ta sprawdza obecność grup karbonylowych w cukrach redukujących, poprzez utlenienie obecnej np. w glukozie grupy aldehydowej. Jednocześnie kwas 3,5-dinitrosalicylowy jest redukowany do kwasu 3-amino,5-nitrosalicylowego w warunkach alkalicznych, zgodnie z reakcją:



1 mol cukru reaguje z 1 molem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego [184].

Mimo, że metodę DNS opracowano w 1959 r., jest ona nadal szeroko stosowana, zarówno w pracach poświęconym aktywności enzymatycznej, jak i mikrobiologicznej. Do podstawowych zalet metody zaliczany jest niski koszt analizy oraz łatwość wykonania. Wielu autorów podaje czułość metody w zakresie stężeń glukozy 0.1-2.5

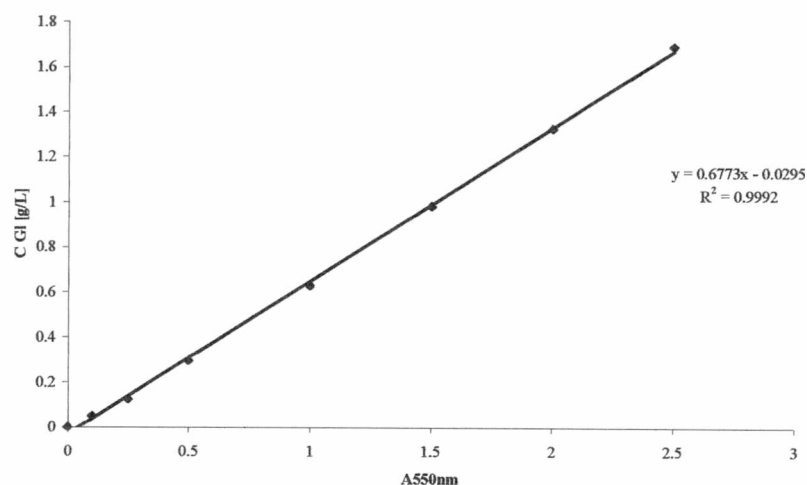
g/dm³. Odnotowano problemy analityczne w przypadku określenia stężeń w mieszaninie cukrów oraz w przypadku zabarwienia analizowanego roztworu. W niniejszej pracy jedynym cukrem obecnym w analizowanej pożywce była glukoza, dodatkowo pożywka ta nie była zabarwiona. Próbki, w których stężenie glukozy było <0.1 g/dm³, poddano zateżaniu przez odparowanie w temperaturze 50 °C.

Odczynnik DNS do testu przygotowano w sposób następujący:

Rozpuszczono 19.8 g NaOH, 306 g winianu sodowo-potasowego, 10.6 g kwasu 3,5-dinitrosalicylowego, 7.6 g fenolu (stopiony w temperaturze 50 °C), 8.3 g pirosiarczynu sodowego w 1416 cm³ wody. Otrzymany roztwór przesączono, a następnie przeprowadzono miareczkowanie potencjometryczne 0.1 mol/dm³ HCl. Na zmiareczkowanie 3 cm³ odczynnika DNS potrzeba 5-6 cm³ titranta. Jeżeli zużyto mniej kwasu, dodano NaOH.

Pomiary wykonywano według następującej procedury:

1 cm³ próbki inkubowano z 3 cm³ odczynnika DNS przez 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 95 °C. Po ostudzeniu dodano 16 cm³ wody. Glukozę oznaczono przez pomiar absorbancji przy $\lambda=550$ nm w ciągu 30 minut od połączenia próbki z odczynnikiem DNS (wobec ślepej próby: woda+odczynnik DNS, inkubowanej w taki sam sposób jak próbki). Przykładową krzywą wzorcową przedstawiono na Rys. 6.8.4.



Rys. 6.8.4

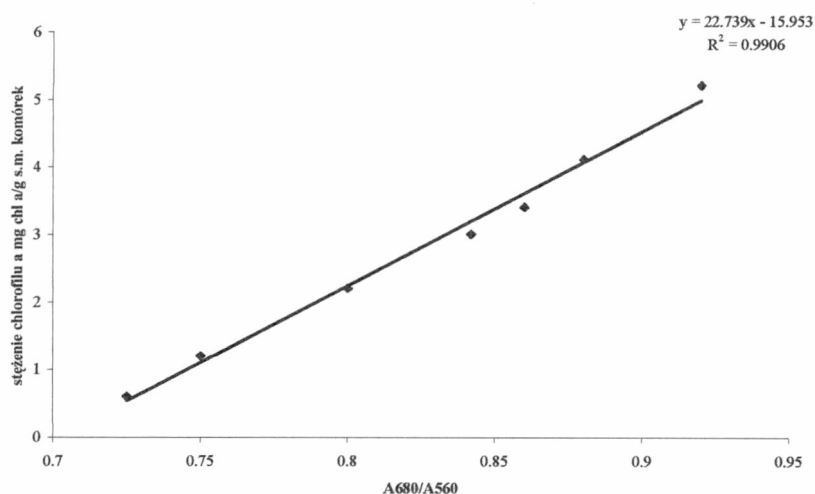
Przykładowa krzywa wzorcową testu glukozowego DNS

– Stężenie komórkowe chlorofilu

Zawartość chlorofilu mierzono wg procedury [193]. Zawiesinę komórek o znanym stężeniu odwirowano. Supernatant odrzucono. Dodano 5 cm³ bezwodnego metanolu. Inkubowano w ciemności w temperaturze 4 °C przez 2 h. Zawiesinę odwirowano. Stężenie chlorofilu określono przez pomiar absorbancji A₆₆₅. Zastosowano przelicznik podany przez

autorów [193]: jednostce absorbancji przy 665 nm odpowiada 74.5 mg chl/cm³. Chlorofil oznaczony wg powyższej procedury posłużył jako odnośnik przy analizie zawartości barwników fotosyntetycznych nie wprost: na podstawie pomiaru absorbancji zawiesiny komórek przy $\lambda=680$ nm oraz 560 nm. Zaobserwowano liniową zależność stosunku wartości tych absorbancji (A_{680}/A_{560}) od stężenia chlorofilu. Podczas gdy A_{560} nm jest miarą stężenia komórek, A_{680} jest jednocześnie miarą stężenia komórek oraz stężenia chlorofilu. W związku z tym stosunek A_{680}/A_{560} będzie proporcjonalny do stężenia chlorofilu w komórkach (6.8.1, Rys. 6.8.5).

$$\begin{aligned}
 A_{560} &= a \cdot X \\
 A_{680} &= b \cdot X + c \cdot C_{Chlr-r} \\
 \frac{A_{680}}{A_{560}} &= \frac{b \cdot X + c \cdot C_{Chlr-r}}{a \cdot X} = \frac{b}{a} + \frac{c}{a} \cdot \frac{C_{Chlr-r}}{X} = A + B \cdot C_{ChlwX} \\
 \frac{A_{680}}{A_{560}} &\sim C_{ChlwX}
 \end{aligned}
 \tag{6.8.1}$$



Rys. 6.8.5

Zależność stosunku absorbancji A_{680}/A_{560} i komórkowego stężenia chlorofilu

– Ciepło spalania

Wartość opałową biomasy wyznaczono analizatorem termicznym DTA Netzsch STA 409c (Niemcy) ze spektrometrią masową gazowych produktów rozkładu MS-Balzers. Wartość kaloryczną obliczono na podstawie energii wydzielonej w trakcie spalania. Analiza DTA polega na jednoczesnym pomiarze różnicy temperatury pomiędzy badaną próbką a odnośnikiem znajdującym się w tych samych warunkach termicznych podczas ich podgrzewania do określonej temperatury. Obserwowana różnica temperatur jest automatycznie przeliczana na zmianę entalpii.

– Skład elementarny komórek

Skład elementarny komórek oznaczono przy zastosowaniu analizatora elementarnego CHONS EA 3000 Euro Vector (Włochy). Próbkę uległą katalitycznemu rozkładowi w tlenie w temperaturze $> 1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ w reaktorze kwarcowym. Obecne katalizatory zredukowały powstające tlenki azotu do N_2 oraz utleniły powstały tlenek węgla do dwutlenku. Wytworzone gazy, odpowiednio dla C - CO_2 , N- N_2 , H- H_2O , S- SO_3 transportowane z gazem nośnym uległy rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej z wypełnieniem. Piki chromatograficzne analizowano ilościowo z wykorzystaniem detektora TCD.

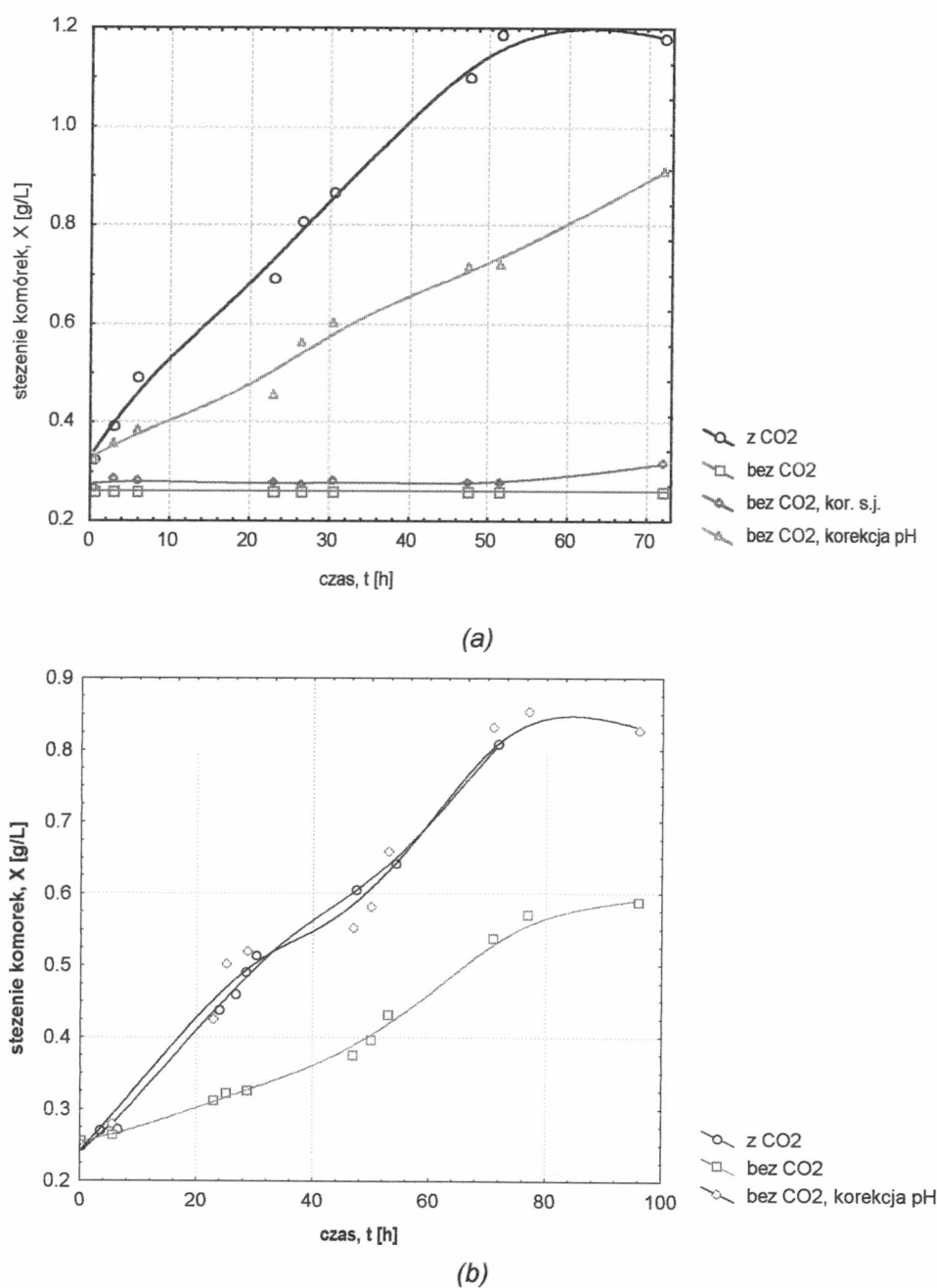
^{*)} *Dobór pożywki*

Ważnym zagadnieniem jest dobór odpowiedniej pożywki wzrostowej dla metabolizmów: auto-, hetero- oraz miksotroficznego, w szczególności źródła węgla. O ile dane literaturowe dotyczące składu pożywki autotroficznej są wyczerpujące [312], informacje na temat składu pożywki hetero- i miksotroficznej są nieprecyzyjne [179-182, 292]. Teoretycznie, nie powinna istnieć konieczność stosowania nieorganicznego źródła węgla (NaHCO_3) w tych hodowlach, gdyż w metabolizmie heterotroficznym CO_2 jest produktem, a w miksotroficznym metabolitem przejściowym. Jednak, jak wykazały wyniki doświadczalne, hodowla heterotroficzna (Rys. 6.8.6a) i miksotroficzna (Rys. 6.8.6b) była niemożliwa przy braku NaHCO_3 w pożywce. Konieczne było zatem wyjaśnienie roli tego składnika w hodowli mikroalg.

W hodowlach hetero- i miksotroficznych, stężenie CO_2 było stałe podczas trwania hodowli. Obecność NaHCO_3 w pożywce okazała się być niezbędna, gdyż wodorowęglan nie pełnił jedynie roli nieorganicznego źródła węgla, ale również miał funkcję buforującą pH pożywki (Rys. 6.8.6). W przypadku braku tego składnika przyrost biomasy nie był w ogóle obserwowany w obu typach hodowli, a pH pożywki wynosiło 4.5, (podczas gdy optymalne pH do wzrostu to 8). W hodowlach, których prowadzono ciągłą korekcję pH obserwowano przyrost biomasy: w hodowli heterotroficznej identyczny w obecności jak i przy braku CO_2 , w hodowli miksotroficznej natomiast niższy, co było prawdopodobnie wywołane fotoinhibicją, wytworzeniem nadmiaru wzbudzonych elektronów, na skutek braku cyklu Calvina, który jest ich akceptorem. W pewnym stopniu komórki były w stanie same wyprodukować CO_2 , jednak ilość ta była mniejsza niż optymalna, w związku z czym hodowla była limitowana przez CO_2 .

Wyniki te obrazuje Rys. 6.8.6, na którym przedstawiono przyrost biomasy w hodowlach hetero- i miksotroficznych na pożywce zawierającej i nie zawierającej CO_2 . Ponieważ, jak się okazało, rolą wodorowęglanu było nie tylko dostarczanie CO_2 dla

składowej autotroficznej metabolizmu, ale również bardzo ważna rola buforująca, dzięki której nie tylko pH początkowe pożywki było optymalne do wzrostu, ale przede wszystkim pH było utrzymywane na w miarę stałym poziomie (7.8-9) i nie przyjmowało wartości skrajnych (np. 3.0 w hodowli heterotroficznej, w której nie prowadzono korekcji pH). W związku z tym pożywki hetero- i miksotroficzne zawierały NaHCO_3 (jak w przypadku pożywki autotroficznej) oraz glukozę.



Rys. 6.8.6

Rola wodorowęglanu w hodowli hetero- (a) oraz miksotroficznej (b)

6.9 Biosorpcja

6.9.1 Mikroorganizm, podłoże i warunki hodowli

Do badań nad biosorpcją stosowano cztery różne formy morfologiczne mikroalg *Spirulina sp.*, opisywane następującymi symbolami:

- R** - liofilizat komórkowy, z firmy SIGMA (USA)
- A** - autotroficzna, wyhodowana na pożywce Zarrouk'a, bez glukozy, przy naświetlaniu (32.7 W/m^2)
- H** - forma heterotroficzna, wyhodowana w ciemności na pożywce typu Zarrouk ($C_{0gl}=1 \text{ g/dm}^3$)
- M** - miksotroficzna, wyhodowana na pożywce Zarrouk'a ($C_{0gl}=1 \text{ g/dm}^3$, $I_{sr}=32.7 \text{ W/m}^2$)

Komórki oddzielano od pożywki przez wirowanie przy 6000 rpm przez 5 minut. Następnie komórki przemywano 3-krotnie wodą dejonizowaną w celu usunięcia pozostałości medium hodowlanego.

6.9.2 Metodyka analityczna

Doświadczenia nad procesem biosorpcji wymagały zastosowania wysokiej klasy sprzętu analitycznego do oznaczania jonów metali, sprawdzającego się w pracy w niskich stężeniach - na poziomie [mg/kg], zapewniającego wysoką precyzję i powtarzalność pomiarów, przy niskich interferencjach spowodowanych obecnością innych jonów. Kryteria takie spełniła nowoczesna aparatura analityczna ICP-AES, udostępniona do badań dzięki uprzejmości Laboratorium Środowiskowego przy Zakładzie Chemii dla Rolnictwa (I26, Politechnika Wrocławska).

- Mineralizacja

Analiza wielopierwiastkowa wymagała próbek w postaci ciekłej, w związku z tym zaistniała konieczność mineralizacji biomasy, co przeprowadzono techniką rozkładu mikrofalowego. Ta nowoczesna metoda roztwarzania próbek (również biologicznych), uniemożliwia niekontrolowane straty pierwiastków śladowych ze związkami lotnymi. Do mineralizacji wykorzystano piec mikrofalowy CEM 2000 (USA) o mocy 630 W - wyposażony w układ teflonowych naczyń ciśnieniowych. Mineralizacja próbek przebiegała pod ciśnieniem 1 MPa w bombach teflonowych, wykonanych z materiału polimerowego PFA, wysoce opornego na działanie stężonych odczynników chemicznych i minimalizującego adsorpcję zanieczyszczeń na ściankach naczyń.

Do ok. 0.1 g biomasy dodano 3 cm^3 stężonego, spektralnie czystego HCl oraz 3 cm^3 stężonego, spektralnie czystego HNO_3 , następnie zamknięto w bombie teflonowej i

umieszczono w piecu mikrofalowym. Po mineralizacji roztwór rozcieńczono do objętości 50 cm³ i poddano analizie wielopierwiastkowej techniką ICP-AES.

- Analiza wielopierwiastkowa

Oznaczenia stężeń jonów metali w roztworze i w komórkach przeprowadzono optycznym, emisyjnym spektrometrem plazmowym ICP-AES (Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy) (Philips Scientific PU 7000, Wielka Brytania) - aparatem do analiz wielopierwiastkowych (z Laboratorium Środowiskowego przy Zakładzie Chemii dla Rolnictwa (Instytut Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych, Politechnika Wrocławska). Spektrometr plazmowy jest wyposażony w monochromator typu Echelle *prism cross dispersion*. Oznaczenia wykonuje się w zakresie 200-820 nm.

Istotą metody ICP jest wykorzystanie bogatego widma emisyjnego wzbudzonej indukcyjnie plazmy argonowej w temperaturach w zakresie 6000-10000 K. Metoda ta polega na pomiarze emisji natężenia linii widma powstałego w indukcyjnie wzbudzonej plazmie argonowej. Spektralna analiza emisyjna wykorzystuje promieniowanie elektromagnetyczne wysyłane przez próbki poddane procesom wzbudzenia wywołanym najczęściej przez źródła termiczne. Widmo pierwiastka jest ściśle związane z jego liczbą atomową, która determinuje rodzaj i liczbę przejść oraz ich energię, a w konsekwencji emitowane długości fal wykorzystywane przez optyczną spektroskopię emisyjną.

- Powierzchnia sorpcyjna komórek

Powierzchnię sorpcyjną komórek oznaczono z wykorzystaniem zaadaptowanej metody oznaczania powierzchni właściwej gruntów [242]. W metodzie tej błękit metylenowy posłużył jako sorbat. Przyjęto, że 1 g błękitu metylenowego jest sorbowany przez 20,94 m² [237] powierzchni sorpcyjnej mikroalg. Dokładność tej metody pozytywnie zweryfikowano sorpcją gazowego azotu metodą BET^{*)}.

Zastosowano następującą procedurę: 0,15 cm³ przefiltrowanego roztworu błękitu metylenowego o stężeniu 11,1 g/dm³ dodano do 50 cm³ zawiesiny komórek. Po 30 minutach inkubacji, próbkę przefiltrowano. Określono stężenie błękitu metylenowego metodą spektrofotometryczną przy $\lambda=665$ nm. Na podstawie ubytku stężenia barwnika, oznaczono powierzchnię sorpcyjną komórek mikroalg.

6.9.3 Metodyka badawcza

- Doświadczenia nad biosorpcją jonów metali

^{*)} dzięki uprzejmości Pana Prof. Z. Sadowskiego z Instytutu Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych, Politechniki Wrocławskiej

W doświadczeniach nad biosorpcją trzech kationów metali: Cr^{3+} , Cd^{2+} oraz Cu^{2+} wykorzystano cztery formy morfologiczne mikroalg *Spirulina*: R (liofilizat), H (forma heterotroficzna), M (forma miksotroficzna), A (forma autotroficzna). Komórki odwirowano oraz przemyto 3-krotnie wodą destylowaną. Nawązkę biomasy zawieszono w roztworze modelowym o znanym, różnym początkowym stężeniu kationów. Inkubowano przez okres czasu wystarczający do osiągnięcia stanu równowagi (wyznaczony z doświadczeń kinetycznych jako 30 minut) w danej temperaturze. Po ustaleniu stanu równowagi, biomase oddzielono od roztworu poprzez wirowanie. Supernatant oraz biomase zachowano do analizy pierwiastkowej techniką ICP-AES.

- Oznaczenie grup funkcyjnych na powierzchni komórek mikroalg

Przeprowadzono miareczkowanie potencjometryczne powierzchni komórek mikroalg w celu oznaczenia stałych dysocjacji kwasowej grup funkcyjnych o właściwościach kationowymiennych, znajdujących się na powierzchni ściany komórkowej.

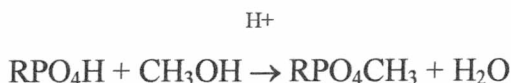
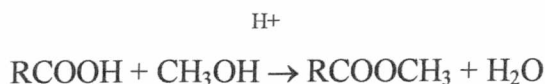
Komórki oddzielono od pożywki hodowlanej poprzez wirowanie i przemyto trzykrotnie wodą dejonizowaną, w celu usunięcia składników pożywki, które mogły się połączyć z powierzchnią komórek. Następnie komórki zawieszono w 20 cm³ wody dejonizowanej, przez którą uprzednio przepuszczano argon przez 3 godziny, w celu usunięcia rozpuszczonego CO₂. Miareczkowanie prowadzono w specjalnej komorze, ograniczającej kontakt miareczkowanej zawiesiny z powietrzem atmosferycznym. Następnie przeprowadzono miareczkowanie 0,1 mol/dm³ NaOH i 0,1 mol/dm³ HCl (biurety automatyczne Brand Bürette Digital II). pH zawiesiny mikroalg zapisywano po dodaniu porcji titranta, po ustabilizowaniu odczytu. Przeprowadzono kolejno miareczkowania: (1)NaOH, (2)HCl, (3)NaOH, (4)HCl w celu sprawdzenia odwracalności procesu. Po miareczkowaniu zawiesinę odwirowano i wysuszono do stałej masy w wysuszonych probówkach wirówkowych, oznaczając w ten sposób stężenie biomasy mikroalg.

- Potwierdzenie charakteru grup funkcyjnych - selektywna blokada chemiczna

W celu określenia charakteru grup funkcyjnych, dokonano ich selektywnej blokady [121].

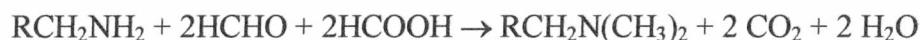
Blokada grup karboksylowych i fosforanowych:

- ok. 0,03 g komórek zawieszono w 65 cm³ bezwodnego metanolu i 1,2 cm³ stężonego kwasu solnego. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 24 h w temperaturze pokojowej. Biomase oddzielono przez wirowanie i przemyto 5-krotnie wodą dejonizowaną. Komórki zawieszono w 20 cm³ wody dejonizowanej i przeprowadzono miareczkowanie. Procedura ta spowodowała estryfikację grup karboksylowych oraz fosforanowych. Reakcja przebiegała zgodnie z równaniem:



Blokada grup aminowych:

- ok. 0,03 g komórek zawieszono w 20 cm³ formaldehydu i 40 cm³ kwasu mrówkowego. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 24 h. Dalej postępowano jak w przypadku blokady grup karboksylowych. Procedura ta spowodowała metylację grup aminowych. Reakcja przebiega zgodnie z równaniem:



Zgodnie z założeniem, blokowanie grup funkcyjnych powinno doprowadzić do obniżenia wydajności biosorpcji, przy czym w przypadku blokowania grup karboksylowych i fosforylowych przewiduje się większy udział w wiązaniu jonów metalu. Zdolność wiązania jonów metalu przez grupy karboksylowe i fosforylowe powinna zostać zablokowana na drodze reakcji estryfikacji, a grup aminowych na drodze metylacji [121].

- Określenie stałych wiązania jonów metalu do poszczególnych grup funkcyjnych obecnych na powierzchni komórek mikroalg

Oznaczono wartości stałych powinowactwa jonów metalu do poszczególnych grup funkcyjnych. Przeprowadzono biosorpcję miareczkowanych mikroalg, czyli określono wpływ pH na pojemność biosorpcyjną. Doświadczenie to przeprowadzono dla wszystkich czterech form morfologicznych komórek oraz dla jonów Cr³⁺.

Odwirowaną i przemytą biomasę alg zawieszono w roztworze zawierającym ok. 2 meq/dm³ kationów metalu. Następnie zawiesinę miareczkowano 0,1 mol/dm³ NaOH. Podczas miareczkowania, po odnotowaniu wartości pH, pobierano próbki o objętości 2,5 cm³ w celu oznaczenia stężenia kationów metodą ICP-AES w roztworze.

- Desorpcja związanej z metalem biomasy

Zawierającą jony metali biomasę odwirowano i przemyto trzykrotnie wodą dejonizowaną (w której zanalizowano stężenie kationów) w celu usunięcia pozostałości roztworu. Następnie, biomasę umieszczono w próbówce zawierającej 1 cm³ czynnika desorpcyjnego. Zastosowano dwa różne eluenty: 0.01, 0.1 oraz 1.0 mol/dm³ kwas azotowy oraz 0,1 mol/dm³ EDTA (sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego). Próbki inkubowano przez 30 minut w temperaturze 35 °C. Zawiesinę odwirowano, supernatant i

biomasę zachowano do analizy na zawartość kationów. Ilość zdesorbowanego metalu określono na podstawie bilansu masy.

6.10 Bioakumulacja

Hodowle miksotroficzne ($C_{0GI}=2.5 \text{ g/dm}^3$, $I=32.7 \text{ W/m}^2$) prowadzono w obecności jonów Cr^{3+} w zakresie stężeń początkowych (3-26 mg/kg) w mineralnej pożywce typu Zarrouk z dodatkiem glukozy. Początkowo pobierano próbki co 15 minut, następnie co 1-2 h. Oznaczano te same wskaźniki co w hodowli miksotroficznej bez jonów metalu. Dodatkowo, monitorowano stężenie jonów Cr^{3+} .

- *Rozpoznanie mechanizmu bioakumulacji*

W celu określenia udziału etapu pasywnego i aktywnego bioakumulacji oraz mechanizmu procesu, przeprowadzono analizę w czasie zawartości jonów metalu w roztworze, na powierzchni komórek oraz w ich wnętrzu. Zawiesinę komórek (5 cm^3) pobierano podczas procesu bioakumulacji a następnie odwirowano. Supernatant wykorzystano do analizy wskaźników hodowli oraz stężenia jonów Cr^{3+} w roztworze. Komórki inkubowano w 5 cm^3 $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HNO}_3$ przez 5 minut. Kwas azotowy w takim stężeniu powoduje całkowite odmycie jonów metalu związanych z powierzchnią komórki bez ich destrukcji. Zawiesinę odwirowano. W supernatancie oznaczono stężenie jonów metalu, natomiast komórki wykorzystano do oznaczania stężenia metalu w ich wnętrzu. Do biomasy komórek dodano 5 cm^3 stężonego HNO_3 i umieszczono w łaźni wodnej (temperatura $60 \text{ }^\circ\text{C}$) na 15 minut. W takich warunkach komórki podlegają całkowitemu roztworzeniu. Analiza roztworu pomineralizacyjnego pozwoliła na oznaczenie zawartości metalu w komórkach.

6.11 Oczyszczanie ścieków przemysłowych

- *Ścieki*

Przeprowadzono oczyszczanie przykładowych rzeczywistych ścieków przemysłowych z zakładów produkujących miedź oraz inne metale nieżelazne. W procesie produkcyjnym powstają ścieki o niskim stopniu zanieczyszczenia i dużej objętości ($7000 \text{ m}^3/\text{d}$). Dotychczas zakłady prowadziły oczyszczanie metodą sedymentacji osadu oraz korekcji pH, ale proces ten okazał się nieefektywny w usuwaniu pierwiastków śladowych. Ścieki posiadają jasno-żółty kolor oraz zawierają szeroką gamę zanieczyszczeń w stężeniach śladowych (na poziomie $\mu\text{g/kg}$). Większość z tych zanieczyszczeń jest obecna w stężeniu niższym niż dopuszczalne. Stwierdzono podwyższony poziom rtęci, kadmu, arsenu oraz azotu-amonowego.

- Oczyszczanie ścieków

Proces prowadzono tak, by poniesione nakłady były możliwie najniższe, tzn. zastosowano surowe ścieki bez wzbogacania w składniki pokarmowe, nie stosowano sztucznego naświetlania ($I=1.24 \text{ W/m}^2$). Oczyszczanie przeprowadzono w termostatowanym reaktorze mieszalnikowym o objętości roboczej 1 dm^3 (IKA LR 1000, Niemcy) (35°C , 100 obr./min.) przez 24 godziny. Inoculum stanowiło 0.25 g liofilizatu komórek *Spirulina sp.* Pobrane próbki (10 cm^3) odwirowano przez 10 min. przy 6000 obr./min. Przeprowadzono analizę wielopierwiastkową metodą ICP-MS (Varian UltraMass 700 Australia), azot-amonowy oznaczono elektrodą gazową Orion 9512, USA. Stężenie rtęci określono analizatorem AMA 254 (absorpcja atomowa), Czechy.

- Układ separacji komórek

Proces mikrofiltracji zawiesiny komórek przeprowadzono w aparacie firmy Minitan (wypożyczonej, dzięki uprzejmości firmy Millipore, Polska). Wykorzystano dwie membrany Durapore $0.2 \mu\text{m}$, każda o powierzchni 60 cm^2 .

7. HODOWLA BIOMASY

7.1 Hodowla autotroficzna

Światło jest jedynym źródłem energii w metabolizmie autotroficznym. W zależności od natężenia stymuluje lub hamuje wzrost. Mimo, że w literaturze traktowane jest jako substrat, należy odnotować ważne różnice: naturę fizyczną, a nie chemiczną światła oraz zmienność jego natężenia w ośrodku hodowlanym. Ze względu na specyfikę tego źródła energii, dla każdego fotobioreaktora oraz dla każdego szczepu mikroorganizmów w nim hodowanych należy przeprowadzić odrębną dyskusję nad wpływem średniego natężenia światła (I_{sr}) oraz gradientu jego natężenia w poszczególnych przekrojach reaktora ($I(z)$) na wzrost komórek.

7.1.1 Natężenie światła w reaktorze

W hodowli mikroalg, światło jest absorbowane przez zawieszoną komórek, składniki pożywki oraz wodę. W związku z tym występuje profil natężenia światła w zależności od drogi penetracji oraz stężenia biomasy ($I(z, X(t))$). Poszczególne komórki alg podlegają działaniu zmiennych warunków świetlnych: przemieszczają się pomiędzy regionami afotycznymi (zbyt niskie do wzrostu natężenie światła), fotycznymi (natężenie światła odpowiednie do wzrostu) oraz hiperfotycznymi (natężenie światła wywołujące fotoinhibicję) [104, 200]. Jednoczesne istnienie stref całkowitej ciemności, limitacji, wysycenia oraz inhibicji światłem wpływa na szybkość wzrostu komórek. Szczególnie niebezpieczne jest występowanie stref hiperfotycznych.

W celu osiągnięcia maksymalnej produktywności, światło o wysycającym natężeniu powinno być w sposób możliwie homogenicznie dystrybuowane w całej objętości fotobioreaktora. Utrzymanie natężenia światła pomiędzy natężeniem krytycznym a wysycającym jest możliwe, tylko gdy panują warunki pełnego przemieszania, droga penetracji światła jest bardzo krótka, stężenie komórek bardzo niskie, czyli wtedy gdy strefy o skrajnym natężeniu światła zajmują niewielki udział objętości reaktora, a komórki przebywają w nich odpowiednio krótko.

- *Lokalne natężenie światła*

W fotobioreaktorze natężenie światła w każdym jego przekroju poprzecznym jest inne ($I(z)$). Dodatkowo, natężenie światła zmienia się w trakcie prowadzenia hodowli okresowej. Zatem, precyzyjne określenie warunków świetlnych panujących w reaktorze wymaga

uwzględnienia, że zmianom w czasie podlega profil natężenia światła, czyli natężenie w każdym przekroju reaktora.

- Profil natężenia światła

Gdy prostopadłościenny reaktor jest naświetlany z jednej strony, natężenie światła w danym przekroju reaktora zmniejsza się z odległością oraz jako skutek absorpcji przez zawieszoną komórek w pożywce $I(A(z), X(t))$, co jest opisywane prawem Lamberta-Beera. Natężenie światła w odległości od naświetlanej powierzchni:

$$I(z) = I_0 e^{-(\alpha \cdot X \cdot z)} \quad (7.1.1)$$

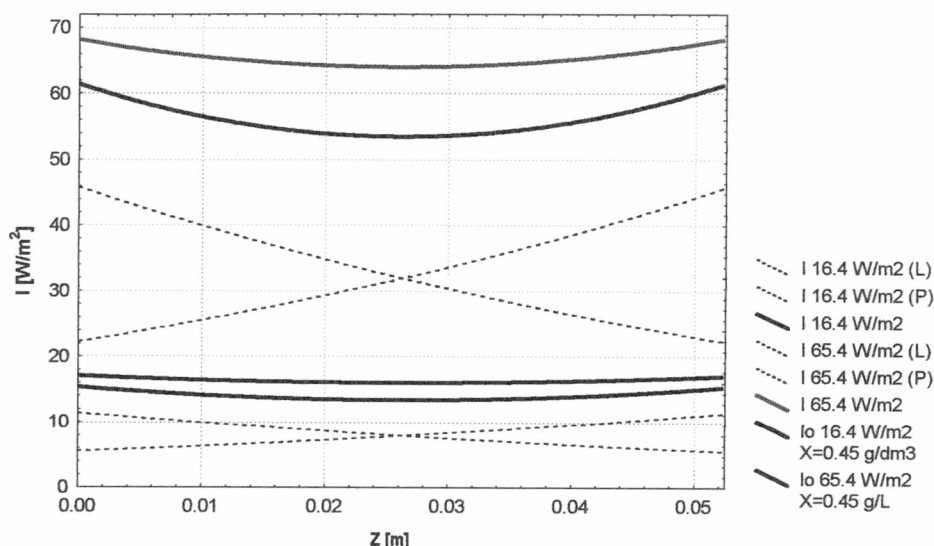
W przypadku, gdy reaktor jest naświetlany dwustronnie (schemat reaktora przedstawiono na Rys. 6.2.1), natężenie światła (w danym przekroju) padającego z dwóch naprzeciwległych ścianek będzie podlegać superpozycji:

$$I(z) = I_0 e^{-(\alpha \cdot X \cdot z)} + I_0 \cdot e^{-(\alpha \cdot X \cdot (L-z))} \quad (7.1.2)$$

Na Rys. 7.1.1 przedstawiono przykładowe profile natężenia światła w reaktorze przy średnim natężeniu (7.1.3) $I_{sr} = 16.4 \text{ W/m}^2$ oraz 65.4 W/m^2 , $X = 0.3 \text{ g/dm}^3$, co odpowiada warunkom początkowym prowadzenia hodowli. Jako skutek namnożenia biomasy $I(z)$ ulega obniżeniu, a gradient natężenia światła staje się większy. Przykładowo, przy rozważaniu zmiany stężenia wszystkich komórek (żywych i martwych) z 0.30 na 0.45 g/dm^3 , zmiana natężenia światła z I_{max} (przy naświetlanej dwustronnie ścianie, $I(z=0)$ do I_{min} (w centrum

reaktora, $I(z=2.62 \text{ cm})$) $\frac{I(0, X) - I(\frac{z}{2}, X)}{I(0, X)}$ wynosi przy stężeniu komórek $X = 0.3 \text{ g/dm}^3$ 6.2 %,

natomiast przy $X = 0.45 \text{ g/dm}^3$ 13.0 %. Średnie natężenie światła (7.1.3) ulega natomiast obniżeniu (odpowiednio) z 16.4 na 14.0 W/m^2 oraz z 65.4 na 57.1 W/m^2 , czyli ok. 14 %. Dlatego zarówno zmiany średniego natężenia światła jak i jego dystrybucji w reaktorze podczas hodowli powinny mieć wpływ na jej przebieg.



Rys. 7.1.1

Profil natężenia światła w reaktorze: lokalne natężenie światła (I) w funkcji położenia w reaktorze (z) przy $I_{sr}=16.4 \text{ W/m}^2$ ($I_{ścianka}=11.5 \text{ W/m}^2$, $I_{ścianka \text{ z 2 stron}}=17.05 \text{ W/m}^2$, $I_{środek}=16.00 \text{ W/m}^2$) oraz $I_{sr}=65.4 \text{ W/m}^2$ ($I_{ścianka}=45.9 \text{ W/m}^2$, $I_{ścianka \text{ z 2 stron}}=68.20 \text{ W/m}^2$, $I_{środek}=64.00 \text{ W/m}^2$); $X=0.3 \text{ g/dm}^3$ oraz 0.45 g/dm^3 ; (L) - lewa ścianka, (P) - prawa ścianka

- Koncepcja średniego natężenia światła

Opisując hodowlę mikroalg istotne jest określenie, czy komórki mikroalg odbierają gradient natężenia światła, czy jedynie zmianę średniego natężenia w czasie. Należy również sprawdzić, czy natężenie światła można uznać za parametr stały podczas całej hodowli. W literaturze dyskusję warunków świetlnych najczęściej pomija się i upraszcza, podając jedynie natężenie światła padającego na naświetlaną powierzchnię [104]. Takie podejście ma sens tylko przy bardzo niskim stężeniu komórek i krótkiej drodze penetracji światła oraz odnosi się tylko do konkretnej konstrukcji reaktora.

Z doniesień literaturowych wynika, że komórki mikroalg posiadają tolerancję na chwilowe, pulsacyjne zmiany w natężeniu światła [103]. Metabolizm komórkowy jest na tyle wieloetapowym i złożonym procesem, że posiada inercję. Komórki akumulują pewną ilość energii (faza jasna fotosyntezy), co umożliwia kontynuowanie procesu fotosyntezy gdy komórka wchodzi w obszary o zbyt niskim do wzrostu I (faza ciemna fotosyntezy). W literaturze podaje się opisy doświadczeń w których określono wpływ częstotliwości błysków światła na szybkość wzrostu komórek. Literatura donosi, że istnienie świetlno-ciemnych cykli o czasie trwania 10-100 s może mieć znaczny wpływ na wydajność wykorzystania energii świetlnej, podczas gdy czas trwania pulsów krótszy niż 10 s (w reaktorach o drodze penetracji światła $< 400 \text{ mm}$) nie wpływa na obserwowaną średnią szybkość wzrostu komórek (fotoaklimacja lub integracja świetlna) [114]. W związku z tym, w niniejszej pracy, w reaktorze o krótkiej drodze penetracji światła ($< 300 \text{ mm}$) i pełnym przemieszaniu przyjęto, że natężenie światła w reaktorze jest stałe w każdym jego przekroju, natomiast natężenie to

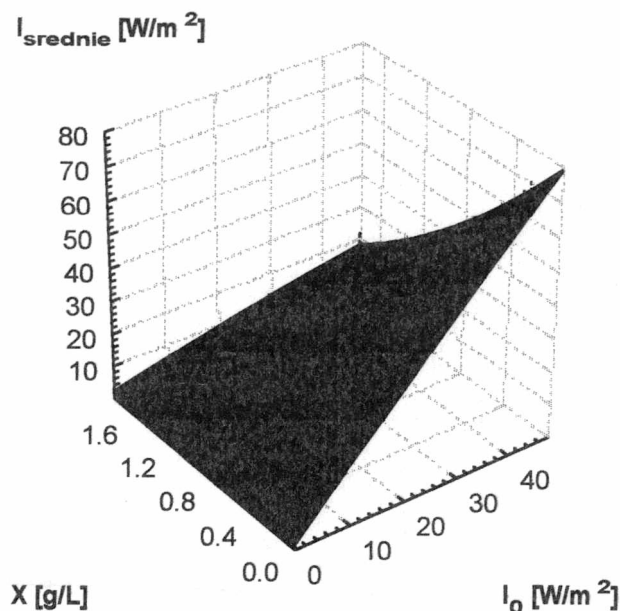
zmienia się w czasie wraz z przyrostem stężenia komórek. Takie podejście opiera się na założeniu, że przy odpowiedniej dynamice płynów, czas przebywania każdej komórki w każdym położeniu jest bardzo krótki, a komórki odbierają natężenie światła jako średnie, równe średniej z lokalnych jego natężeń [200] : $\bar{\mu} = f(\bar{I})$.

Średnie natężenie światła (uśrednione względem z : $(I(z, X(t)))$ sprowadzono do $I(X(t))$) w reaktorze określono jako średnią całkową:

$$I_{sr} = \bar{I}(z) = \frac{\int_0^L I(z) dz}{L} = \frac{I_0}{L} \int_0^L e^{-(\alpha \cdot X \cdot z)} + e^{-(\alpha \cdot X \cdot (L-z))} dz = \quad (7.1.3)$$

$$\frac{I_0 \{e^{-2L\alpha X} (-e^{-L\alpha X} + -e^{-2L\alpha X}) - e^{-L\alpha X} (1 - e^{-L\alpha X})\}}{L\alpha X}$$

Na podstawie (7.1.3) określono wpływ natężenia światła na naświetlanej ścianie reaktora oraz stężenia komórek na wartość średniego natężenia światła (I_{sr}) (Rys. 7.1.2) w skonstruowanym reaktorze ($\alpha=45.7 \text{ dm}^3/\text{gm}$, $L=0.0525 \text{ m}$). Współczynnik absorpcji α ośrodka, obejmujący absorpcję przez biomase, składniki pożywki oraz wodę, wyznaczono doświadczalnie. Ponieważ I_{sr} (substrat fizyczny) będzie podlegać zmianom w trakcie trwania hodowli okresowej, można doszukiwać się tu analogii światło-substrat: natężenie światła (podobnie jak stężenie substratu chemicznego) zmniejsza się na skutek przyrostu biomasy.



Rys. 7.1.2

Wpływ stężenia komórek (X) oraz natężenia światła przy pojedynczej, jednostronnie naświetlanej ścianie reaktora (I_0) na średnie natężenie światła (I_{sr})

- Określenie warunków świetlnych panujących w reaktorze w hodowli autotroficznej

Hodowle autotroficzne przeprowadzono w zakresie natężenia światła 8-65 W/m² (średnie natężenie początkowe). W Tabeli 7.1.1 przedstawiono wartości natężenia światła przy jednostronnie naświetlanej ścianie (I_0) oraz średnie natężenie światła (I_{sr}) w reaktorze przy różnym stężeniu komórek 0.3-0.6-1.8 g/dm³. W przeciwieństwie do I_{sr} , I_0 jest wielkością niezależną od stężenia biomasy, a więc stałą w trakcie trwania hodowli, a charakteryzującą ilość światła emitowaną przez każdą z dwóch naświetlanych ścianek reaktora.

Hodowlę zaszczipiano każdorazowo liofilizatem komórek mikroalg, w którym stopień reaktywacji (oznaczony poprzez wielokrotne pasażowanie hodowli w fazie wzrostu) wynosił 53 %. Wobec tego w hodowli są obecne komórki żywe oraz nieżywe. Do określenia szybkości wzrostu wzięto pod uwagę komórki żywe, natomiast przy rozważaniu profilu światła w reaktorze uwzględniono sumę stężenia komórek żywych oraz nieżywych, ponieważ światło podlega absorpcji przez oba rodzaje komórek. Poszczególne hodowle opisywano poprzez podanie wielkości średniego natężenia światła przy $X=0.3$ g/dm³ (Tabela 7.1.1).

Tabela 7.1.1
Natężenie światła przy jednostronnie naświetlanej ścianie (I_0) oraz średnie natężenie światła w reaktorze przy różnym stężeniu komórek I_{sr}

Lp.	natężenie światła przy jednostronnie naświetlanej ścianie I_0 [W/m ²]	średnie natężenie światła w reaktorze I_{sr} [W/m ²] przy $X=$		
		0.3 g/dm ³	0.6 g/dm ³	1.8 g/dm ³
1	5.7	8.2	6.1	2.6
2	11.5	16.4	12.2	5.2
3	17.2	24.5	18.2	7.9
4	22.9	32.7	24.3	10.5
5	28.7	40.9	30.4	13.1
6	34.4	49.0	36.4	15.7
7	40.2	57.2	42.5	18.3
8	45.9	65.4	48.6	20.9
$I_{sr}/2I_0$		<u>0.713</u>	<u>0.530</u>	<u>0.228</u>

7.1.2 Kinetyka wzrostu mikroorganizmów

Wartości wskaźników statycznych u mikroalg *Spirulina sp.* zależą od parametrów hodowli. W związku z tym teoretyczne rozważania stechiometryczne nie będą w tym przypadku wystarczające do ich wyznaczenia. Konieczne zatem było przeprowadzenie prac eksperymentalnych w celu określenia wpływu parametrów hodowli na wielkości statyczne.

- Dane kinetyczne

Na Rys. 7.1.3-7.1.6 przedstawiono dane kinetyczne z przebiegu przykładowych hodowli ($I_{sr}=24.5$ - limitujące natężenie światła oraz 49.0 W/m^2 - wysycające natężenie światła (limitujące oraz wysycające natężenie światła będzie dyskutowane w dalszej części pracy, w rozdziale Model wzrostu biomasy w hodowli autotroficznej, Rys. 7.1.7a)), podczas których monitorowano stężenie żywych komórek (X) (Rys. 7.1.3), całkowite stężenie komórek (Rys. 7.1.4), azotu azotanowego (c_N) (Rys. 7.1.5), dwutlenku węgla (c_{CO_2}) oraz pH (Rys. 7.1.6a). Tabele i wykresy z pozostałych hodowli znajdują się w załączonym do pracy dysku CD-ROM (plik *autotrof.xls*).

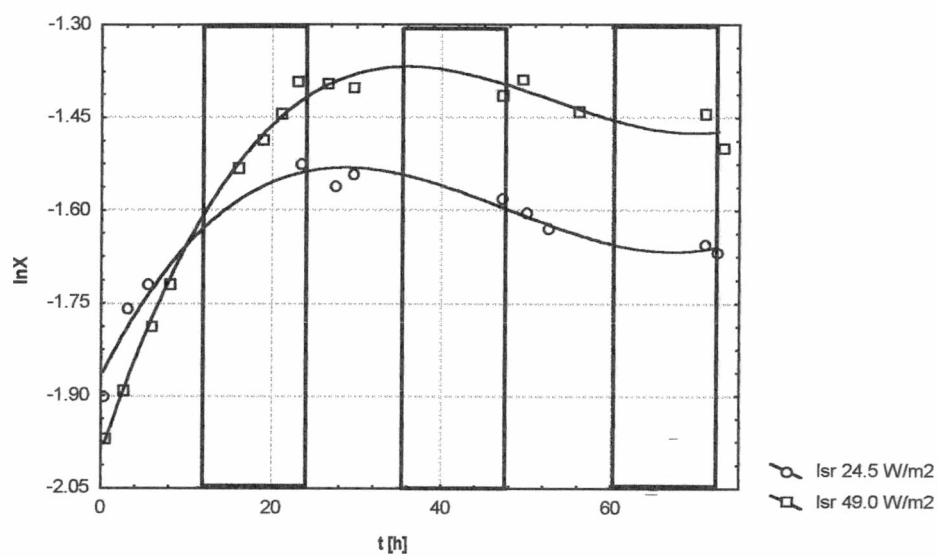
- Analiza krzywej wzrostu

Na podstawie analizy krzywych wzrostu (Rys. 7.1.3 oraz *autotrof.xls*) odnotowano niskie końcowe stężenie biomasy - nie przekraczające 0.5 g/dm^3 (Rys. 7.1.3). Lag faza nie jest widoczna, faza wzrostu logarytmicznego trwa krótko (mniej niż 24 h). Następnie hodowla wchodzi w fazę stacjonarną i obumierania. Hodowla autotroficzna cechuje się niską szybkością wzrostu komórek. Tak niskie szybkości wzrostu oraz niskie stężenia komórek są jednak typowe dla mikroorganizmów fotosyntetycznych, w szczególności dla *Spirulina*. Uzyskane wyniki pozostają w zgodzie z danymi literaturowymi [96, 103, 104, 155, 156, 309].

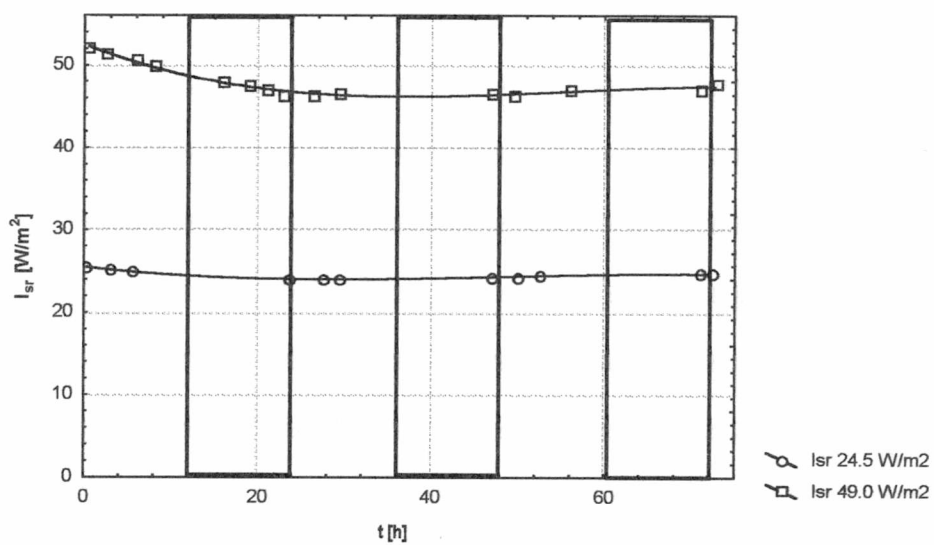
Niewielki przyrost biomasy wynika z blokady o naturze fizjologicznej. Podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu blokady w oparciu o biologię komórki. Problem przedyskutowano jedynie skrótowo*, gdyż temat ten wykracza poza zakres niniejszej pracy.

- Analiza zmian warunków świetlnych

Namnażaniu biomasy towarzyszy zmiana profilu natężenia światła i w konsekwencji zmiana jego średniego natężenia w czasie. Jest to skutek zwiększonej absorpcji światła spowodowanej nawet niewielkim w warunkach autotroficznych przyrostem biomasy (Rys. 7.1.4). Hodowla przy $I_{sr}=24.5 \text{ W/m}^2$ leży w obszarze limitującego natężenia światła (Rys. 7.1.3), natomiast hodowla przy $I_{sr}=49.0 \text{ W/m}^2$ - w obszarze wysycającego natężenia, w którym komórki rosną z większą szybkością i osiągane jest wyższe końcowe stężenie komórek. Gdy hodowla wchodzi w fazę obumierania (stężenie komórek zmniejsza się, jako skutek lizy), I_{sr} nieznacznie rośnie (w fazie obumierania absorbancja A_{560} , służąca jako narzędzie wyznaczania stężenia komórek, maleje w czasie) (Rys. 7.1.4). W hodowli autotroficznej zmiany w stężeniu biomasy były na tyle niewielkie, że nie stwierdzono dużych różnic w I_{sr} oraz wielkości gradientu. Zatem przyjęcie średniego natężenia światła wydaje się w pełni uzasadnione.



Rys. 7.1.3
Przykładowe krzywe wzrostu w hodowli fotoautotroficznej



Rys. 7.1.4
Zmiany w średnim natężeniu światła spowodowane przyrostem biomasy

* Orientacja mikroalg w warunkach świetlnych

Odpowiednia reakcja organizmów żywych, zwłaszcza roślin oraz mikroorganizmów fototroficznych na warunki świetlne ma fundamentalne znaczenie w ich współzawodnictwie o przeżycie [7, 8].

Widzenie jest definiowane w znaczeniu ogólnym jako absorpcja światła i konwersja na sygnał wykorzystywany w procesach życiowych [4]. Jest to zdolność odbierania przez organizmy żywe informacji o świetle otaczającym za pośrednictwem ukształtowanych bodźców świetlnych [1, 9]. Właściwości światła wykorzystywane do tego celu to: natężenie, polaryzacja, barwa oraz kierunek padania. Jednokomórkowe algi, w szczególności *Chlamydomonas*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Volvox* oraz *Spirulina* znajdują się wśród najmniejszych organizmów zdolnych do odbierania bodźców świetlnych [6]. Za pomocą cząsteczek fotoreceptorów, monitorują natężenie oraz jakość światła w ich środowisku życia [3]. Odpowiednie umiejscowienie fotoreceptorów na komórce oraz system optyczny zapewniają precyzyjne odczytanie kierunku padającego światła. Układ optyczny jest zbudowany z warstw bogatych w karotenoidy globuli lipidowych upakowanych heksagonalnie i odbijających, interferujących oraz absorbujących światło [12]. Fotoreceptory ukierunkowane są głównie na absorpcję niebieskiego, zielonego oraz czerwonego światła [5], gdyż takie światło jest wykorzystywane w procesie fotosyntezy [2]. Absorpcja przebiegająca w paśmie (pod)czerwonym oraz zielonym widma światła widzialnego, powoduje izomeryzację: fotochemiczne przejścia $cis \rightleftharpoons trans$. W przypadku *Spirulina sp.* przejścia takie przebiegają w karotenoidach [5], których zawartość w komórce sięga 0.2 % [11].

Cyjanobakterie wykształciły szereg strategii adaptacyjnych, umożliwiających przeżycie gatunku [13]. W szczególności dotyczyły one światła, jako podstawowego źródła energii i reakcji na nie: odpowiedzi fototaktycznych, fotokinetycznych oraz fotofobicznych [4], ułatwiających gatunkowi przetrwanie w warunkach naturalnych, ale znacznie utrudniających ich masową produkcję, w której dąży się do uzyskania wysokich finalnych stężeń biomasy. Już dawno zauważono, że stężenie komórek *Spirulina sp.* nie przekracza 0.4-0.6 g s.m./dm³ w hodowli okresowej. W warunkach naturalnych bowiem (w jeziorach), przy takim stężeniu biomasy światło jest całkowicie absorbowane po przejściu przez 4-6 cm zawiesiny komórek (efekt samozacieniania). Podjęto szereg prób zmian w konstrukcji reaktorów, minimalizując drogę penetracji światła [10]. Nie spowodowało to jednak zwiększenia końcowego stężenia biomasy, a jedynie doprowadziło do zwiększenia szybkości jej przyrostu. Odkryte w ostatnich latach możliwości wzrostu hetero- oraz mikсотroficznego komórek otworzyły nowe perspektywy w zakresie zwiększenia produktywności biomasy *Spirulina sp.*

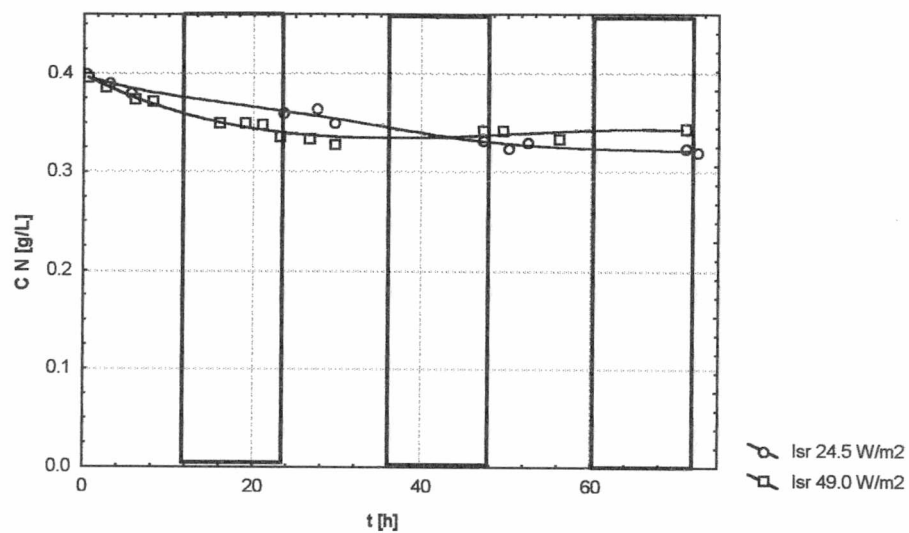
- [1] Ahmad M., *Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors*, 1999, Curr. Opin. Plant. Biol., 2, 230-235
- [2] Gilbert P.M., Pitcher G., *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*, 2001, SCOR/IOC, Baltimore, 47-48
- [3] Hader D.P., Kumar H.D., Smith R.C., Worrest R.C., *Effects on aquatic ecosystems*, 1998, J. Photoch. Photobiol. B., 46, 53-68
- [4] Hegemann P., *Vision in microalgae*, 1997, Planta, 203, 265-274
- [5] Hellingwerf K.J., *Key issues in the photochemistry and signaling-state formation of photosensor proteins*, 2000, J. Photochem. Photobiol. B, 54, 94-102
- [6] Kondo T., Ishiura M., *The circadian clocks of plants and cyanobacteria*, 1999, Trends Plant Sci., 4(5), 171-176
- [7] Kondrashov A. S., *Comparative genomics and evolutionary biology*, 1999, Curr. Opin. Genom. Develop., 9, 624-629
- [8] Norberg J., *Linking Nature's services to ecosystems: some general ecological concepts*, 1999, Ecol. Econ., 29, 183-202
- [9] Pigliucci M., *How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa)*, 1996, TREE, 11(4), 168-173
- [10] Richmond A.E., *Handbook of Microalgal mass Culture*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1986, 285-318.
- [11] Sarada R., Pillai M.G., Ravishankar G.A., *Phycocyanin from Spirulina sp.: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin*, 1999, Process Biochem., 34, 795-801
- [12] Sinha R.P., Klisch M., Groniger A., Hader D.P., *Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae*, 1998, J. Photochem. Photobiol. B., 47, 83-94
- [13] Staley J.T., *Biodiversity: are microbial species threatened*, 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8, 340-345

Hodowla podlegała fotoperiodowi 12:12 (niebieskie pola na Rys. 7.1.3-7.1.6 oznaczają czas ciemności). W okresie ciemnym przyrost biomasy nie powinien być dostrzegany. Nie znaleziono jednak eksperymentalnego potwierdzenia tej hipotezy (Rys. 7.1.3). Wynika stąd, że w fazie jasnej komórki magazynują wystarczającą ilość energii świetlnej w postaci wysokoenergetycznych związków chemicznych (ATP, NADPH) do zachowania ciągłości metabolicznej: kontynuowania przyrostu biomasy (czyli fazy ciemnej), będącej asymilacją dwutlenku węgla i syntezą biomasy (cykl Calvin). Gdy hodowlę naświetlano w sposób ciągły (przez 24 h), nastąpiło rozprężenie fazy jasnej i ciemnej, efekt fotoinhibicji i w konsekwencji obumarcie hodowli. Okres ciemności jest zatem niezbędny w hodowli *Spirulina* sp.

- Analiza zmian stężeń substratów: źródła węgla oraz azotu

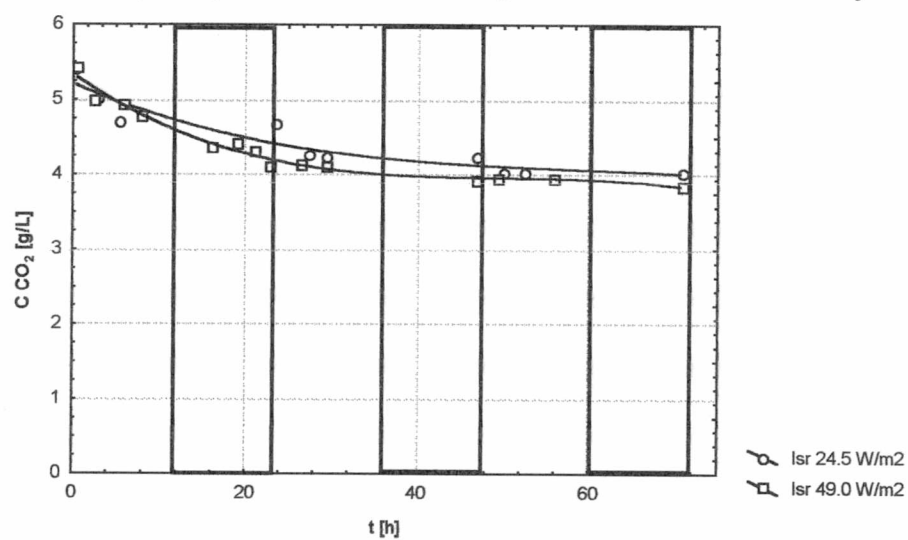
W prowadzonych hodowlach autotroficznych, konsekwencją małego przyrostu biomasy było niewielkie wykorzystanie substratów (azotany, CO₂) (Rys. 7.1.5-7.1.6a). Zarówno zmiany w stężeniu azotu-azotanowego (Rys. 7.1.5), jak i CO₂ (Rys. 7.1.6a) są nieznaczne: odpowiednio ok. 20 % i 30 %. Można w związku z tym przypuszczać, że zarówno CO₂, jak i azot azotanowy w standardowej pożywce autotroficznej są powyżej stężeń limitujących.

Zaobserwowano, że w hodowli autotroficznej w obecności wodorowęglanów, pożywka podlegała alkalizacji (Rys. 7.1.6b): mikroalgi wprowadzały do wnętrza komórki CO₂ w postaci gazowej [303], przesuwając równowagę reakcji: $HCO_3^- \Leftrightarrow CO_2 + OH^-$. Najbardziej intensywna alkalizacja (pH rośnie z 7.8 do 9.2) związana z konsumpcją CO₂ ma miejsce w fazie wzrostu. Gdy hodowla przestaje rosnąć (Rys. 7.1.3), konsumpcja CO₂ ustaje (Rys. 7.1.6a), a pH stabilizuje się (7.1.6b).

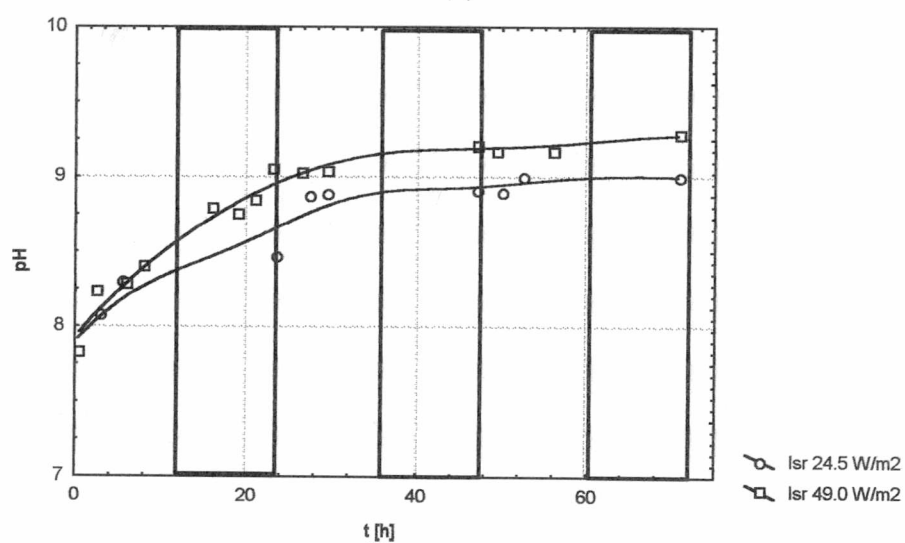


Rys. 7.1.5

Zmiany w stężeniu azotu-azotanowego w hodowli fotoautotroficznej



(a)



(b)

Rys. 7.1.6

Zmiany w stężeniu CO_2 (a) oraz pH (b) w hodowli fotoautotroficznej

- Specyficzna szybkość wzrostu

Szybkość przyrostu biomasy mikroorganizmów jest najczęściej wyrażana jako szybkość specyficzna (właściwa) (7.1.4-7.1.5), w obszarze fazy wzrostu logarytmicznego.

$$\mu = \frac{^{def} r_X}{X} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (7.1.4)$$

$$\mu = \frac{d \ln(X)}{dt} \quad (7.1.5)$$

Stwierdzono, że hodowla w fazie wzrostu logarytmicznego rośnie z maksymalną szybkością w danej hodowli (przy danym I) (μ_m), zmienia się natomiast wraz ze zmianą średniego natężenia światła w czasie (μ).

Na Rys 7.1.7a przedstawiono zależność $\mu_m = f(I_{sr})$ dla metabolizmu autotroficznego, na którym można rozróżnić 3 obszary wzrostu:

1. o limitującym natężeniu światła ($\mu_m < \mu_{max}$),
2. o wysycającym natężeniu światła ($\mu_m = \mu_{max}$),
3. o fotoinhibującym natężeniu światła ($\mu_m < \mu_{max}$).

W obszarze 1, Zwiększanie I powoduje zwiększenie μ_m , ale tylko do momentu osiągnięcia wysycającego natężenia światła (dla tych badań jest to wartość 27 W/m²), powyżej którego μ_m początkowo się stabilizuje (osiągając wartość maksymalną, μ_{max}) (obszar 2), a następnie maleje (fotoinhibicja) po przekroczeniu krytycznego natężenia światła (50 W/m²) (obszar 3). Można zatem stwierdzić, że odpowiednie do wzrostu w hodowli fotoautotroficznej natężenie światła to 30-50 W/m².

Proces fotosyntezy ma naturę fotochemiczną, a na podstawie prawa Einstein'a równoważników fotochemicznych, 1 foton prowadzi do jednego zdarzenia fotochemicznego. Szybkość fotosyntezy, powinna być zatem proporcjonalna do szybkości absorpcji energii świetlnej przez komórki aż do osiągnięcia wysycającego natężenia światła [200].

Występująca powyżej I krytycznej fotoinhibicja to skutek ekspozycji komórek na zbyt wysokie natężenie światła. Z cząsteczek chlorofilu (jako efekt absorpcji zbyt wielu fotonów) zostaje wybitych zbyt wiele wzbudzonych elektronów, by mogły być odebrane przez łańcuch transportu elektronów i wykorzystane do syntezy wysokoenergetycznych związków (ATP, NADPH). Wzbudzone elektrony reagują z produktem fotolizy wody: tlenem, prowadząc do powstania zabójczych dla aparatu fotosyntetycznego i całej komórki, wysokoreaktywnych rodników tlenowych. Organizmy fotosyntetyczne muszą bilansować procesy dostarczania i konsumpcji energii, w celu podtrzymania maksymalnego poziomu jej konwersji i uniknięcia nadmiaru zaabsorbowanej energii w stosunku do ilości wykorzystanej

lub rozproszonej. Konsekwencją jest zniszczenie komórki [185] (tzw. „zatrucie redoks łańcucha transportu elektronów”). Zatem hodowli nie należy prowadzić w obszarze 3, ponieważ wówczas mimo wysokich nakładów energetycznych (w postaci światła) szybkość wzrostu biomasy będzie niewielka.

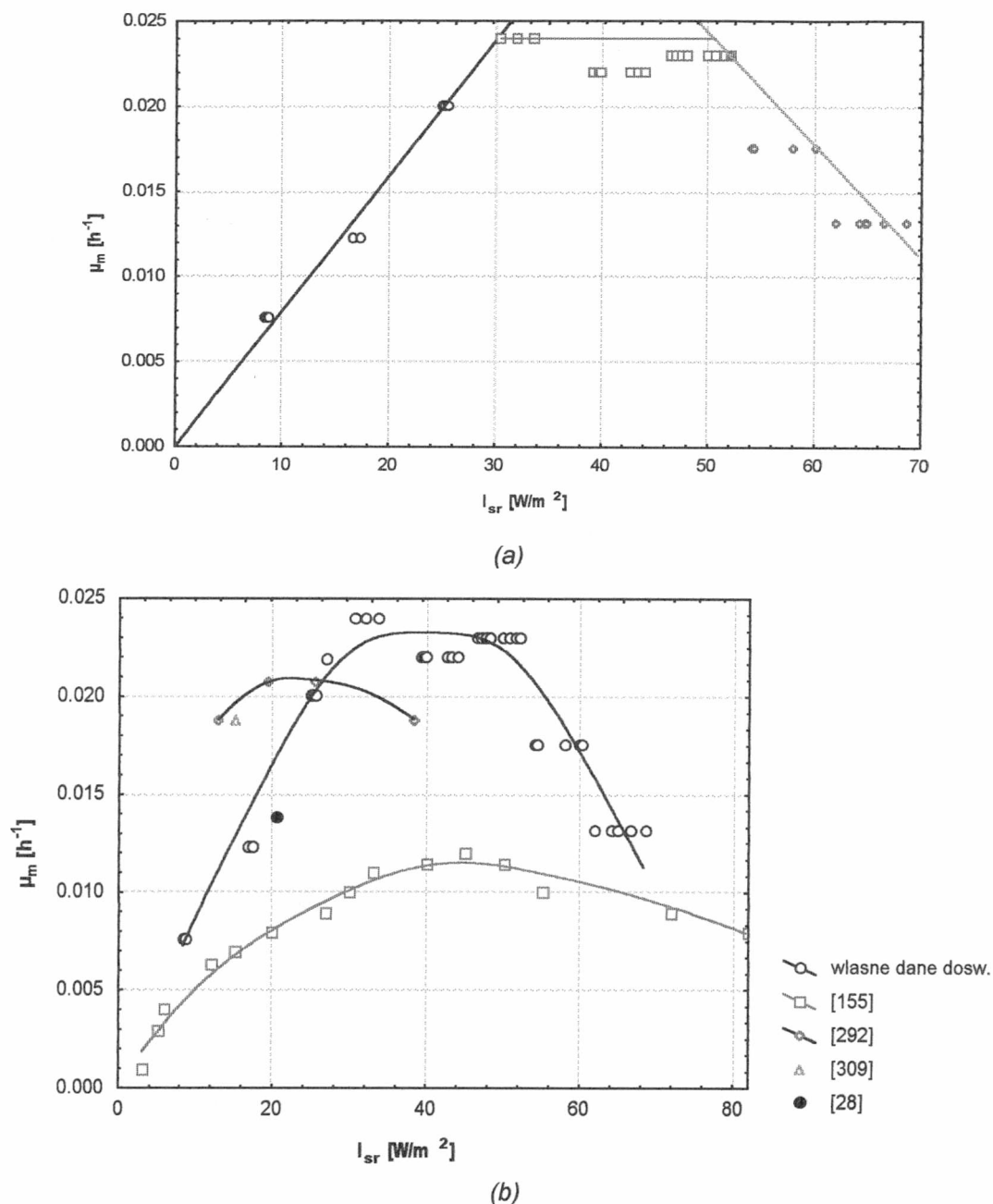
- Model wzrostu biomasy w hodowli fotoautotroficznej

Literatura proponuje wiele modeli ciągłych wiążących natężenie światła ze specyficzną szybkością wzrostu (4.2.2-4.2.19) [98, 114, 155, 156]. Empiryczny charakter ogranicza uniwersalność ich stosowania dla różnych szczepów mikroorganizmów. Zgodnie z przewidywaniami, modele literaturowe nie opisywały wzrostu badanego szczepu *Spirulina* w sposób zadowalający. Zaproponowano nową, zależność μ_m w funkcji I_{sr} (7.1.6). Na podstawie analizy zależności $\mu_m=f(I_{sr})$ (Rys. 7.1.7), stwierdzono występowanie trzech wyraźnie ograniczonych obszarów. Z tej przyczyny zdecydowano się na model opisujący oddzielnie rozpatrywaną funkcję w tych trzech obszarach: o 1) limitującym, 2) wysycającym, 3) inhibującym natężeniu światła (Rys. 7.1.7a):

1. Zgodnie z prawem równoważników fotochemicznych Einstein’a, $\mu_m \sim I_{sr}$: $\mu_m = 7.96 \cdot 10^{-4} \cdot I_{sr} [h^{-1}]$.
2. Istnieje pewne wysycające natężenie światła powyżej którego zwiększanie I_{sr} nie spowoduje zwiększenia μ_m (tu: $27 W/m^2$): $\mu_m = \mu_{max} = const = 0.0242 [h^{-1}]$.
3. Powyżej krytycznego I_{sr} (tu: $52 W/m^2$) występuje zjawisko inhibicji: μ_m jest odwrotnie proporcjonalne do I_{sr} : $\mu_m = -6.60 \cdot 10^{-4} \cdot I_{sr} + 5.73 \cdot 10^{-2} [h^{-1}]$.

$$\mu_m^A = \left\{ \begin{array}{ll} 0.000796 \cdot I_{sr} & dla \quad I_{sr} \in (8, 27 W / m^2) \\ 0.0242 & dla \quad I_{sr} \in (27, 52 W / m^2) \\ -0.000660 \cdot I_{sr} + 0.0573 & dla \quad I_{sr} (> 52 W / m^2) \end{array} \right\} \quad (7.1.6)$$

W literaturze nie spotkano się z wykorzystaniem krzywych łamanych do opisu szybkości wzrostu w metabolizmie fotoautotroficznym. Krzywa łamana umożliwia jednocześnie pozostanie w zgodzie z prawem równoważników fotochemicznych Einstein’a, uwzględnia istnienie *plateau* w obszarze wysycającego natężenia światła oraz występowanie fotoinhibicji powyżej krytycznego natężenia. Ciągła krzywa opisująca proces miałaby bardzo sztuczny charakter i nie odzwierciedlałaby natury procesu, uniemożliwiając wyraźne rozróżnienie tych trzech obszarów.



Rys. 7.1.7

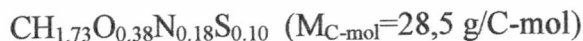
Wpływ średniego natężenia światła na specyficzną szybkość wzrostu (a) model wzrostu mikroalg, wiążący I z μ_m (na podstawie równania 7.1.6) oraz porównanie własnych danych doświadczalnych z danymi literaturowymi

7.1.3 Statyka wzrostu mikroorganizmów

Przez statykę w hodowli mikroalg rozumiane są wszystkie wskaźniki niezależne od czasu, w szczególności skład komórek oraz ich wartość opałowa, wydajność wykorzystania substratów chemicznych (CO_2 , azot azotanowy) i fizycznych (światło) oraz stężenie komórkowe barwników fotosyntetycznych.

- Skład komórek oraz wartość opałowa biomasy

Oznaczono skład komórek fotoautotroficznych biomasy *Spirulina* (analizatorem pierwiastkowym COHNS):



Skład węglomola jest zbliżony do danych literaturowych [103] w których podaje się skład *Spirulina* jako: $\text{CH}_{1.67}\text{O}_{0.44}\text{N}_{0.20}$, $\text{CH}_{1.65}\text{O}_{0.531}\text{N}_{0.17}$

Przedstawiając skład biomasy w postaci $\text{CH}_b\text{O}_c\text{N}_d\text{S}_e$, stopień redukcji, będący miarą liczby dostępnych elektronów w węglomolu biomasy, opisać można następującym wzorem:

$$\gamma_X = 4 + b - 2c - 3d - 2e = 4,23$$

Literatura podaje wartości bardzo zbliżone (odpowiednio): 4.19 i 4.22 [103].

Energia swobodna biomasy [kJ/g] to teoretyczna ilość energii zmagazynowana w biomacie (7.1.7):

$$Q_X = \frac{\sigma_X \gamma_X q_0}{12} = 16.8 \text{ kJ/g} \quad (7.1.7)$$

Jest to jedynie teoretyczna zależność obrazująca bardziej energię swobodną zmagazynowaną w biomacie, niż energię którą można by uzyskać podczas jej spalania. Pomiar wartości opałowej (analiza termograwimetryczna) wykazał nieco niższą wartość rzeczywistą 14.4 kJ/g. Obliczona energia nie uwzględnia bowiem dodatkowych procesów endotermicznych zachodzących w trakcie spalania komórek (np. odparowania wody).

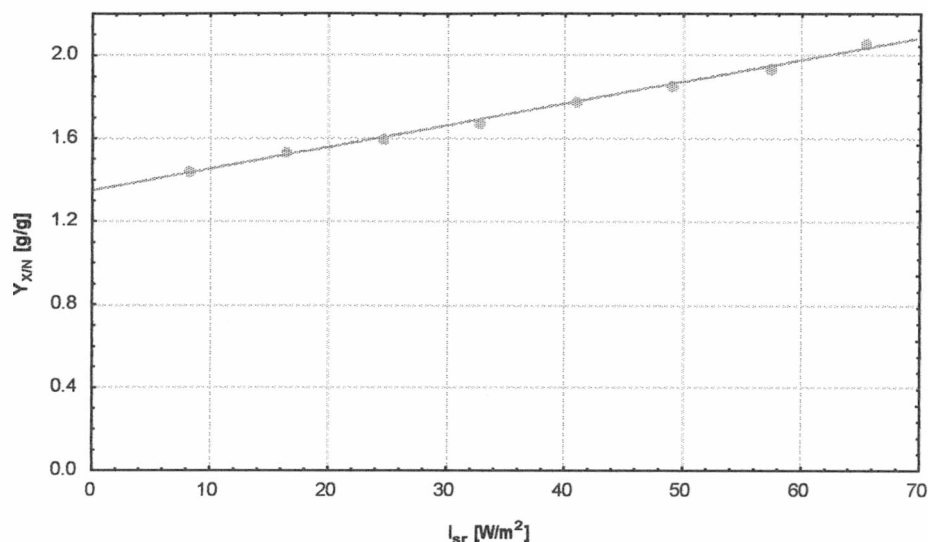
- Wydajność syntezy biomasy względem substratów: azotu i CO_2

Z zależności $X=f(S)$ (7.1.8) [262]

$$Y_{X/S}^{\text{def}} = - \frac{dX}{dS} = \frac{r_X}{r_S} \quad (7.1.8)$$

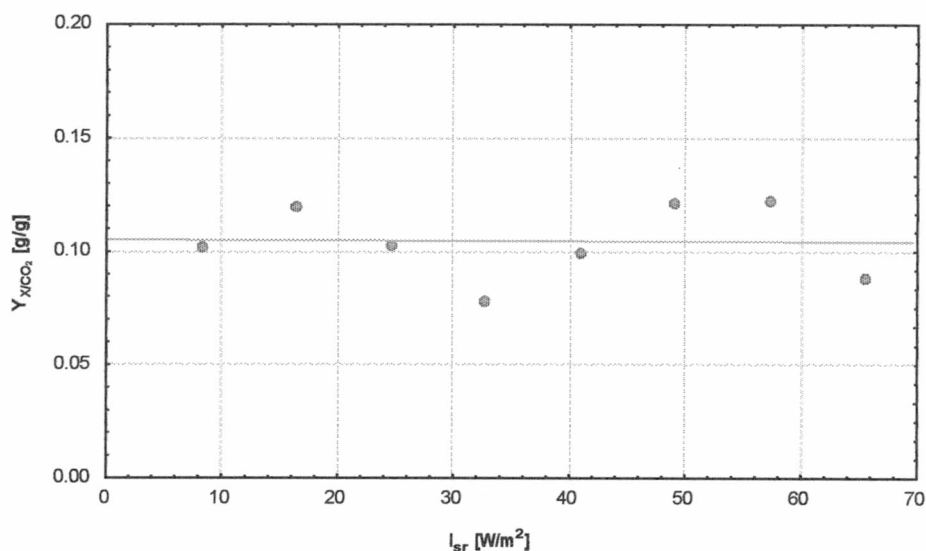
wyznaczono obserwowany współczynnik wydajności biomasy względem azotu ($Y_{X/N}$) (Rys. 7.1.8) oraz CO_2 (Y_{X/CO_2}) (Rys. 7.1.9). Jeżeli cały azot zostaje wbudowany w biomasę, wówczas $Y_{X/N}$ wynosi 11.3. Ponieważ w rzeczywistości wartości współczynnika są niższe, można postulować zachodzenie procesu denitryfikacji. Współczynnik Y_{X/CO_2} może maksymalnie przyjmować wartość 0.65. Wartości tego współczynnika są jednak wielokrotnie niższe, co może świadczyć o stratach CO_2 . Zauważono, że współczynnik wydajności biomasy względem azotu rośnie ze wzrostem natężenia światła, natomiast nie odnotowano wpływu tego parametru na współczynnik Y_{X/CO_2} (Rys. 7.1.9).

Współczynnik wydajności biomasy względem substratu nie jest tożsamy ze stopniem wbudowania substratu w biomasę (Tabela 7.1.2). Zarówno stopień konwersji azotu-azotanowego, jak i CO_2 wynosi poniżej 20 %. Wywołane jest to stratami N_2 (denitryfikacja) oraz CO_2 do atmosfery.



Rys. 7.1.8

Współczynnik wydajności biomasy względem azotu ($Y_{X/N}$) w hodowli autotroficznej w funkcji natężenia światła (I_{sr}).



Rys. 7.1.9

Y_{X/CO_2} w zależności od natężenia światła

Tabela 7.1.2

Przykładowe współczynniki wydajności biomasy względem azotu i CO_2 oraz stopień wbudowania substratu w biomasę

	I_{sr} 24.5 W/m²		I_{sr} 49.0 W/m²	
	$Y_{X/S}$ [g/g]	% wbudowania substratu [%]	$Y_{X/S}$ [g/g]	% wbudowania substratu [%]
azot	1.60	14.2	1.86	16.4
CO ₂	0.103	15.9	0.121	18.7

- Wydajność bioenergetyczna

Określenie wydajności bioenergetycznej posłużyło jako narzędzie do analizy efektywności wykorzystania światła jako źródła energii do syntezy biomasy. Spotkano się z

dwoma metodami wyznaczania współczynników bioenergetycznych u mikroorganizmów fotosyntetycznych:

symbol	wzór	jednostka	charakterystyka
Y_{kJ}^A	$Y_{kJ}^A = \frac{\Delta X_A}{I \cdot A \cdot t}$	[masa biomasy/iłość dostarczonej energii świetlnej]; [g/kJ]; [179-182]	masa komórek wyhodowanych w stosunku do ilości energii dostarczonej w postaci światła; wystarczy określić ile biomasy zostało namnożone w danych warunkach świetlnych
k_{teoret}^A	$k_{teoret}^A = \frac{Q_X}{I \cdot A \cdot t}$	[ilość energii swobodnej związanej w biomacie/iłość dostarczonej energii świetlnej]; [kJ/kJ] - współczynnik bezwymiarowy [96, 103, 104, 155, 156, 309]	stosunek energii swobodnej wyprodukowanej biomasy do ilości dostarczonej energii; niezbędna jest znajomość składu elementarnego komórek.

Przykładowo, teoretyczna wydajność to $k_{teoret}^A = (0.14 \cdot 16.8) / 27.1 = 8.7 \%$ (wykorzystuje teoretyczną entalpię spalania), rzeczywista $k_{rzecz.}^A = (0.14 \cdot 14.4) / 27.1 = 7.4 \%$ (opiera się na doświadczalnej entalpii spalania), natomiast $Y_{kJ}^A = 0.14 / 27.1 = 5.17 \cdot 10^{-3}$ g biomasy/kJ. Wartość ta jest podobna do wyznaczonej przez Marquez i in. [182] ($4.33-6.20 \cdot 10^{-3}$ g biomasy/kJ).

Na Rys. 7.1.10a przedstawiono zależność współczynnika Y_{kJ}^A (wydajności bioenergetycznej w hodowli fotoautotroficznej) od średniego natężenia światła, natomiast na Rys. 7.1.10b wartości bezwymiarowego współczynnika k_{teoret} od natężenia światła oraz porównano z wynikami literaturowymi. Zaobserwowano wykładniczą zależność $k_{teoret} = f(I_{sr})$:

$$k_{teoret} = \alpha \exp(-\beta I_{sr}) = 0.186 \exp(-0.034 I_{sr}) \quad (7.1.9)$$

Podobne wyniki uzyskał Yokota i in. [309]: $\alpha = 0.268$, $\beta = -0.022$.

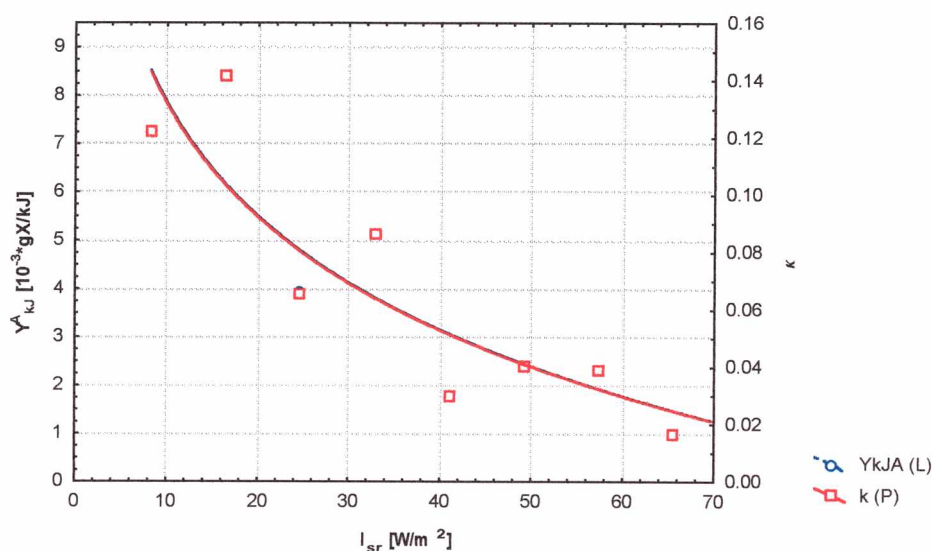
Najwyższą wydajność bioenergetyczną zaobserwowano przy niskim $I_{sr} = 11.5 \text{ W/m}^2$ $k_{teoret} = 0.14$. Wartość tego współczynnika jest 7 razy wyższa niż obserwowanego przy $I_{sr} = 45.9 \text{ W/m}^2$; $k_{teoret} = 0.02$ (Rys. 7.1.10).

Stwierdzono, że różnice w wydajności bioenergetycznej w zależności od natężenia światła mają związek z produkcją pigmentów, które biorą udział w procesie fotosyntezy. Tylko niewielka część energii świetlnej jest wykorzystywana do wzrostu (2-16 %), pozostała jest tracona, głównie w postaci ciepła lub wykorzystywana do podtrzymywania oraz innych nie związanych ze wzrostem aktywności metabolicznych.

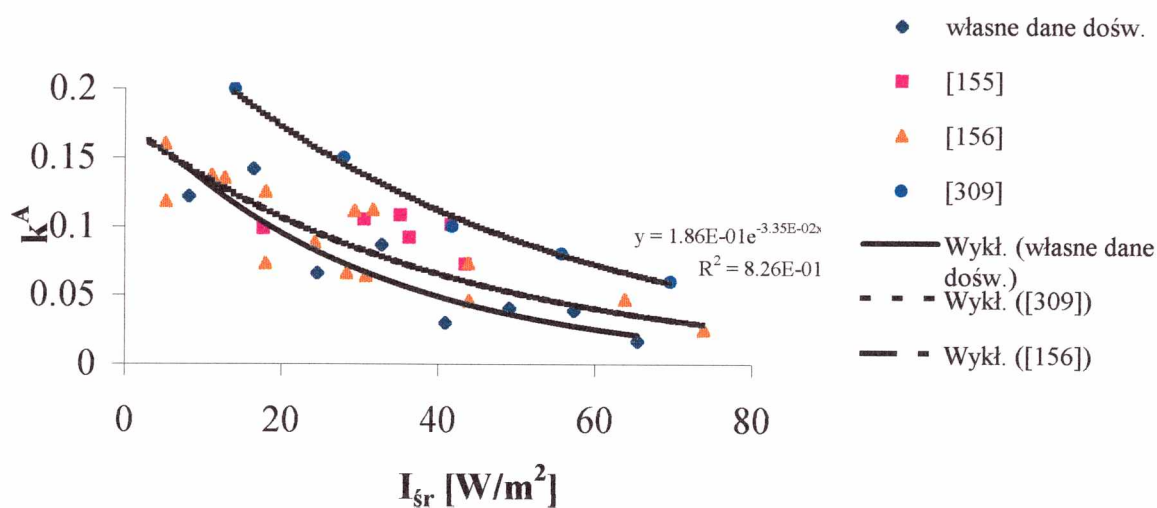
Im wyższe natężenie światła (im więcej dostępnej energii) tym niższa efektywność jego wykorzystania i tym niższe stężenie komórkowe chlorofilu. Należy pamiętać również o niszczącym wpływie zbyt dużego strumienia fotonów na komórki. Synteza mniejszej ilości

chlorofilu przy wyższym I jest działaniem ochronnym przed foto-zniszczeniem aparatu fotosyntetycznego oraz komórki przez rodniki tlenowe powstałe jako skutek zbyt dużego strumienia kwantów świetlnych.

Dlatego hodowlę autotroficzną należy prowadzić tak, by zarówno szybkość wzrostu oraz wydajność wykorzystania energii były możliwie największe (w tym przypadku I_{sr} powinno być w zakresie 30-40 W/m²)



(a)
Współczynnik wydajności bioenergetycznej Y_{kJ}^A [g X/kJ] oraz bezwymiarowy współczynnik k w zależności od natężenia światła



(b)
Bezwymiarowy współczynnik wydajności bioenergetycznej w zależności od natężenia światła w porównaniu do danych uzyskanych przez innych autorów dla *Spirulina*

Rys. 7.1.10

Wpływ natężenia światła na współczynniki wydajności bioenergetycznej

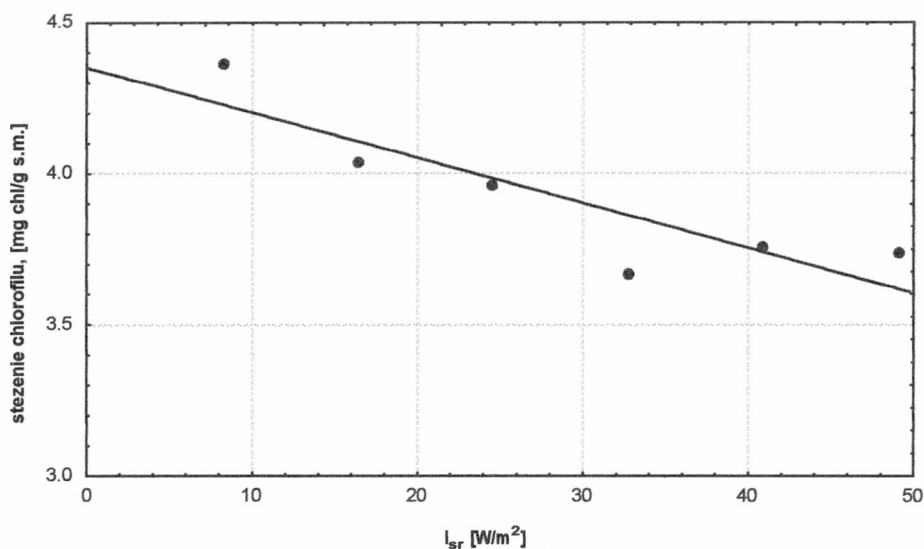
- Barwniki fotosyntetyczne

W literaturze [122] najczęściej podawanym kryterium jakości komórek mikroalg jest zawartość pigmentów. Mając na uwadze, że w niniejszej pracy biomasa jest namnażana do

celów biosorpcyjnych, produktem będzie nie tyle sama ilość biomasy, czy zawartość barwników fotosyntetycznych, ale pojemność biosorpcyjna komórek, czyli liczba miejsc wiążących jony metali ciężkich. Będzie to szerzej dyskutowane w rozdziale 8.

Analiza stężenia chlorofilu, biorącego czynny udział w absorpcji energii świetlnej pozwoli na lepsze zrozumienie metabolizmu autotroficznego, gdyż chlorofil jest katalizatorem procesu fotosyntezy.

Z Rys. 7.1.11 przedstawiającego zależność zmian stężenia chlorofilu w zależności od natężenia światła widać, że im wyższe natężenie światła tym mniej barwników fotosyntetycznych w komórce autotroficznej, co znajduje odzwierciedlenie w zmniejszeniu Y_{kJ}^A ze wzrostem I (Rys. 7.1.10 a). Uzyskane wyniki są analogiczne do prezentowanych w literaturze, która podaje, że zawartość chlorofilu liniowo maleje ze wzrostem natężenia światła [156]. Całkowita zmiana w zawartości chlorofilu jest związana z liczbą jednostek fotosyntetycznych. Światło zaabsorbowane przez algi jest wykorzystywane bardziej efektywnie gdy gęstość receptorów fotosyntetycznych jest duża. Gdy ilość światła jest wystarczająca (lub zbyt wysoka), wówczas syntezowane są komórki zawierające mniejsze stężenie barwników fotosyntetycznych. Jest to przykład strategii adaptacyjnych komórek, ich odpowiedzi na zmieniające się warunki świetlne.



Rys. 7.1.11
Wpływ natężenia światła na stężenie chlorofilu w komórkach

7.2 Hodowla heterotroficzna

Metabolizm heterotroficzny można traktować jako odwrotność procesu autotroficznego. W tym przypadku energia do wzrostu biomasy czerpana jest z substratu organicznego, a nie ze światła, dwutlenek węgla jest produktem, a nie substratem, natomiast tlen jest konsumowany, a nie produkowany. Podobnie, jak w przypadku metabolizmu autotroficznego obserwowana jest konsumpcja azotu-azotanowego oraz przyrost biomasy.

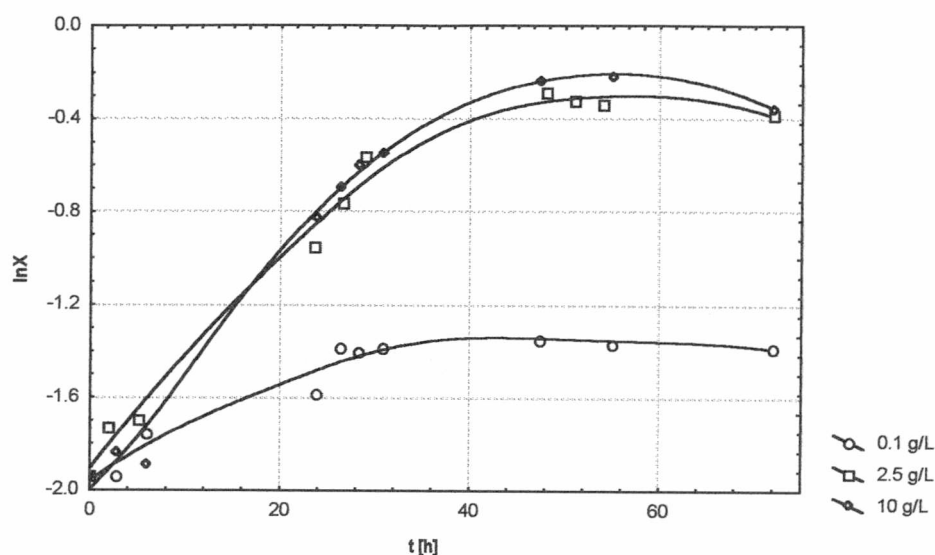
W celu określenia wpływu stężenia glukozy oraz azotu w pożywce hodowlanej na wzrost *Spirulina sp.* przeprowadzono hodowle heterotroficzne przy różnym początkowym stężeniu glukozy (0.1-10 g/dm³) oraz azotu azotanowego (0.1-1.6 g/dm³) w napowietrzanym fotobioreaktorze mieszalnikowym, bez dostępu światła - w całkowitej ciemności. Jako bazę zastosowano standardową, mineralną pożywkę typu Zarrouk wzbogaconą w glukozę oraz azot azotanowy. Tabele wyników z przeprowadzonych hodowli znajdują się na załączonym do pracy dysku CD-ROM (plik *heterotrof.xls*).

7.2.1 Kinetyka wzrostu mikroorganizmów

- Dane kinetyczne

- Analiza krzywej wzrostu

Na Rys. 7.2.1 przedstawiono krzywe wzrostu *Spirulina sp.* przy różnym początkowym stężeniu glukozy. Stężenie 0.1 g/dm³ znajduje się w obszarze limitującym wzrost, natomiast stężenie początkowe 2.5 g/dm³ w obszarze wysycającym. Stwierdzono, że w ciągu pierwszych 30 h hodowli ($C_{0GI} = 2.5 \text{ g/dm}^3$) wzrost ma charakter logarytmiczny ($\mu = \mu_m$), następnie przy osiągnięciu $C_{GI} < 0.1 \text{ g/dm}^3$, hodowla wchodzi w obszar stężenia limitującego glukozy. Inaczej sytuacja przedstawia się przy wysokim stężeniu glukozy ($C_{0GI} = 10 \text{ g/dm}^3$). W tym przypadku faza wzrostu ($\mu_m = \mu_{max}$) trwa również 30 h. Jednak zakończenie tej fazy wiąże się nie z limitującym stężeniem glukozy, lecz azotu-azotanowego, który wcześniej ulega wyczerpaniu. Stężenie końcowe glukozy wynosi 3.7 g/dm³, natomiast w hodowli przy $C_{0GI} = 2.5 \text{ g/dm}^3$, mimo że wcześniej wyczerpaniu uległa glukoza, $C_{IN} = 0 \text{ g/dm}^3$ (Rys. 7.2.2-7.2.3). Prowadząc hodowlę mikroorganizmów, stężenie substratów powinno być tak dobrane, by $\mu_m = \mu_{max}$, a po ukończeniu hodowli zawartość substratów w pożywce była możliwie niska. Rozważając hodowle przy $C_{0GI} 0.1\text{-}2.5\text{-}10 \text{ g/dm}^3$, kryteria takie spełnia hodowla przy $C_{0GI} 2.5 \text{ g/dm}^3$, a azotu-azotanowego 0.4 g/dm³.



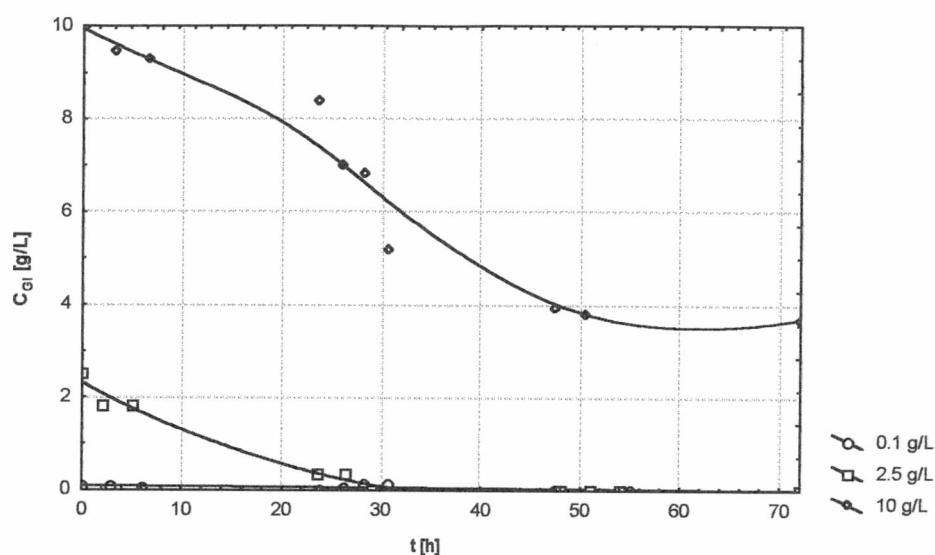
Rys. 7.2.1

Krzywe wzrostu w hodowlach heterotroficznych przy różnym początkowym stężeniu glukozy (0.1-2.5-10 g/dm³), $C_{0N}=0.4$ g/dm³

W hodowli heterotroficznej, uzyskuje się wyższe końcowe stężenie biomasy niż w hodowli fotoautotroficznej. Nie stwierdzono istnienia blokady fizjologicznej, ograniczającej uzyskanie wyższych niż krytyczne stężeń biomasy. Podobnie jak w przypadku hodowli bez glukozy, lag faza jest trudno zauważalna (Rys. 7.2.1). Dwukrotnie dłuższa faza wzrostu oraz większa specyficzna szybkość wzrostu dają wyższe końcowe stężenia biomasy. Po wyczerpaniu któregoś z substratów (limitująca jest glukoza lub azot), hodowla przestaje rosnąć (w analizowanych hodowlach po ok. 40 h).

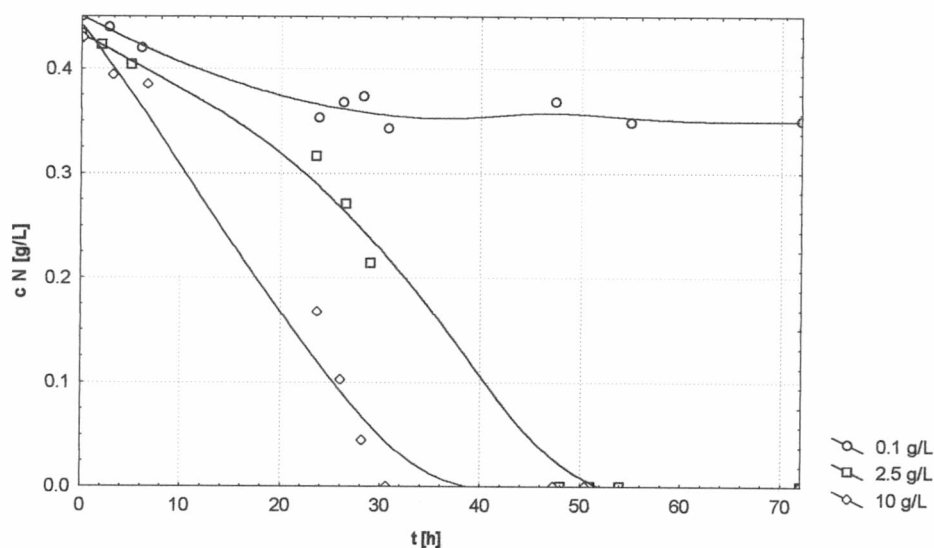
- Analiza zmian stężeń substratów: źródła węgla oraz azotu

Na Rys. 7.2.2 przedstawiono zmiany stężenia glukozy, a na Rys. 7.2.3 azotu, w trakcie trwania hodowli. W hodowlach, w których $C_{0Gl} < 5$ g/dm³, w standardowej pożywce Zarrouk, jedynym substratem w stężeniu limitującym wzrost jest glukoza. Przy wyższym stężeniu glukozy, wcześniejszemu wyczerpaniu ulega jednak azot. W związku z tym, przy wysokich stężeniach glukozy, hodowla będzie w obszarze limitującego stężenia azotu. Stąd wniosek, że należy stosować właściwą proporcję stężenia glukozy i azotu. Hodowle, które posłużyły do wyznaczenia parametrów kinetycznych wzrostu w obszarze limitującego stężenia glukozy, pochodziły z zakresu stężeń glukozy 0.1-2.5 g/dm³ oraz azotu 0.4 g/dm³, a limitującego stężenia azotu przy stężeniu glukozy 7.5 g/dm³, a azotu w zakresie 0.1-1.6 g/dm³.



Rys. 7.2.2

Konsumpcja glukozy w hodowlach heterotroficznych przy różnym początkowym stężeniu glukozy (0.1-2.5-10 g/dm³), $C_{0N}=0.4$ g/dm³



Rys. 7.2.3

Konsumpcja azotu w hodowlach heterotroficznych przy różnym początkowym stężeniu glukozy (0.1-2.5-10 g/dm³), $C_{0N}=0.4$ g/dm³

- Model wzrostu dla hodowli heterotroficznej

Na podstawie analizy przebiegu zależności specyficznej szybkości wzrostu w funkcji stężenia glukozy (Rys. 7.2.4), jak również azotu (Rys. 7.2.5) przyjęto, że krzywe te można opisać za pomocą równania Monoda. Zarówno glukoza, jak i azot są substratami niezbędnymi do wzrostu, niekompetycyjnymi: glukoza jest źródłem węgla i energii, natomiast azot-azotanowy źródłem azotu. W takiej sytuacji proponuje się zastosowanie kinetyki multiplikatywnej:

$$\mu^H = \mu_{\max}^H \cdot \frac{C_{Gl}}{K_{Gl(H)} + C_{Gl}} \cdot \frac{C_N}{K_{N(H)} + C_N} \quad (7.2.1)$$

(Rys. 7.2.6) w której przy $S \gg K_S$ wartość ilorazu $S/(K_S+S) \rightarrow 1$. Jeżeli $C_{Gl} \gg K_{Gl}^H$ oraz $C_N \gg K_N^H$ to $\mu^H = \mu_{\max}^H$ i hodowla będzie poza obszarem limitującego stężenia każdego z substratów. W przypadku gdy stężenie któregoś z substratów będzie w obszarze limitującym ($C_{Gl} < 0.4 \text{ g/dm}^3$, $C_N < 0.2 \text{ g/dm}^3$), $\mu < \mu_{\max}$.

Parametry modelowe, wyznaczone na podstawie analizy regresji nieliniowej (Mathematica 3.0), przedstawiają się następująco (dla hodowli limitowanej glukozą (7.2.2) oraz azotem (7.2.3)):

Dla glukozy jako substratu limitującego (gdy $\frac{C_N}{K_N^H + C_N} \rightarrow 1$ oraz $0.1 < C_{0Gl} < 2.5 \text{ g/dm}^3$):

$$\mu^H = \frac{\mu_{\max}^H C_{Gl}}{K_{Gl}^H + C_{Gl}} \quad (7.2.2)$$

$$\mu_{\max}^H = 0.0449 \text{ h}^{-1}$$

$$K_{Gl}^H = 0.0950 \text{ g/L}$$

$$R^2 = 0.998$$

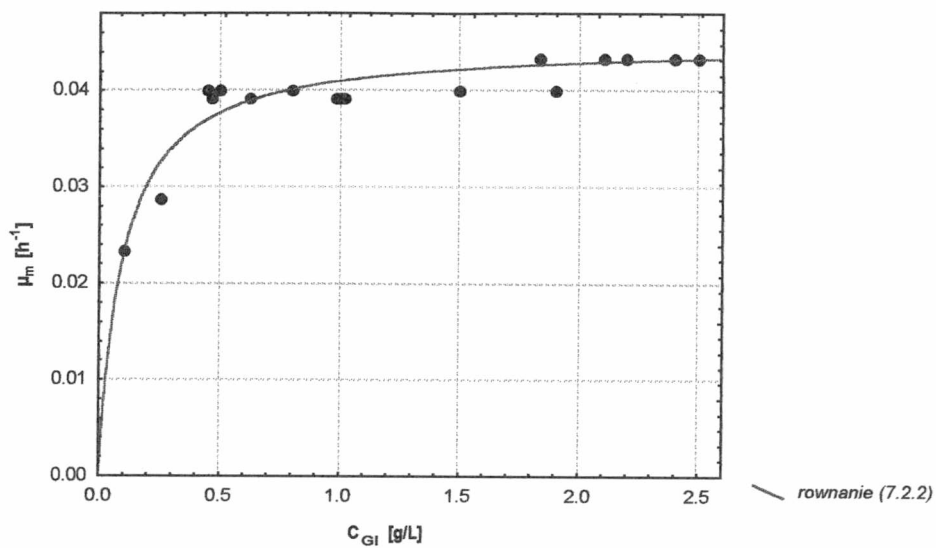
Dla azotu jako substratu limitującego (gdy $\frac{C_{Gl}}{K_{Gl}^H + C_{Gl}} \rightarrow 1$ oraz $0.1 < C_{0N} < 1.6 \text{ g/dm}^3$):

$$\mu_H = \frac{\mu_{\max}^H C_N}{K_N^H + C_N} \quad (7.2.3)$$

$$\mu_{\max}^H = 0.0449 \text{ h}^{-1}$$

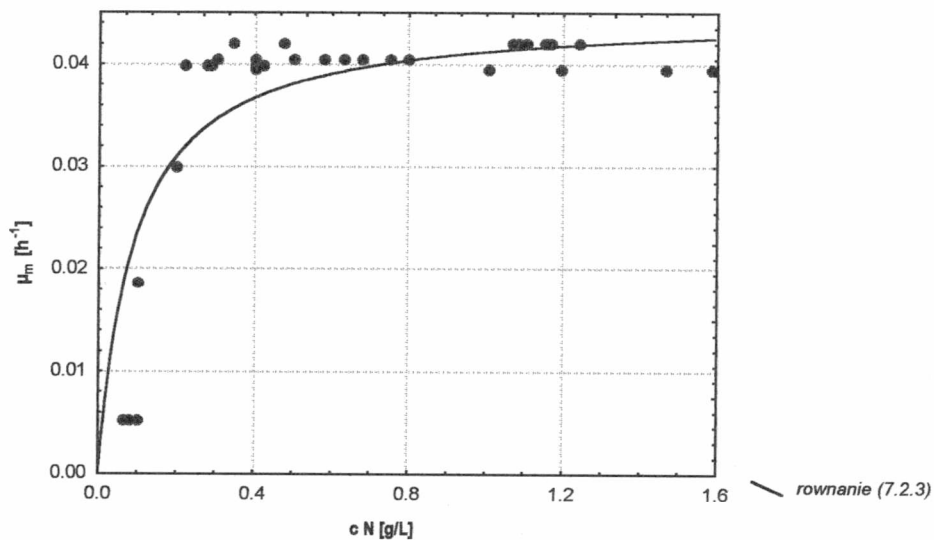
$$K_N^H = 0.0891 \text{ g/L}$$

$$R^2 = 0.975$$



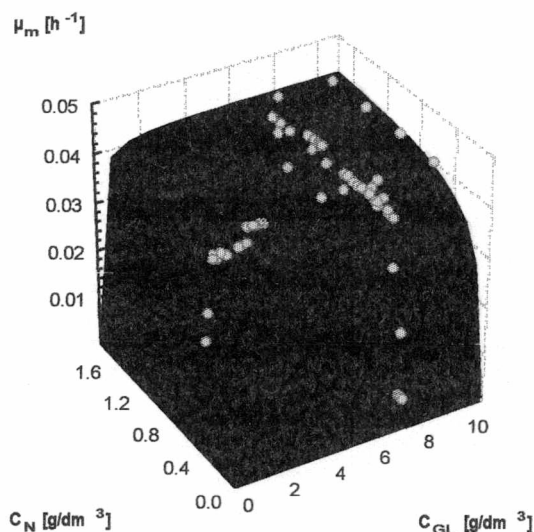
Rys. 7.2.4

Specyficzna szybkość wzrostu w funkcji stężenia glukozy, opisana równaniem Monoda wg wzoru (7.2.2) ($C_{0N}=0.4 \text{ g/dm}^3$, $C_{0Gl}=0.1-2.5 \text{ g/dm}^3$)



Rys. 7.2.5

Specyficzna szybkość wzrostu w funkcji stężenia azotu, opisana równaniem Monoda wg wzoru (7.2.3) ($C_{0Gl}=7.5 \text{ g/dm}^3$, $C_{0N}=0.1-1.6 \text{ g/dm}^3$)



Rys. 7.2.6

Specyficzna szybkość wzrostu w funkcji stężenia glukozy oraz azotu-azotanowego, opisana zależnością multiplikatywną (równanie 7.2.1)

7.2.2 Statyka wzrostu mikroorganizmów

- Skład komórek

Oznaczono skład komórek heterotroficznych (analiza elementarna CHONS):



co umożliwiło wyznaczenie stopnia redukcji

$$\gamma_X=4.43$$

oraz teoretycznej entalpii spalania komórek:

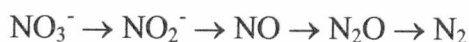
$$Q_X=17.9 \text{ kJ/g}$$

Zarówno stopień redukcji jak i entalpia spalania są wyższe o ok. 5 % w porównaniu do komórek autotroficznych. Komórki heterotroficzne zawierają znacznie mniej tlenu niż autotroficzne. Również stężenie tlenu w pożywce w hodowli heterotroficznej jest niższe niż w autotroficznej. Powoduje to, że entalpia spalania jest wyższa. Zawartość pozostałych makroskładników jest podobna.

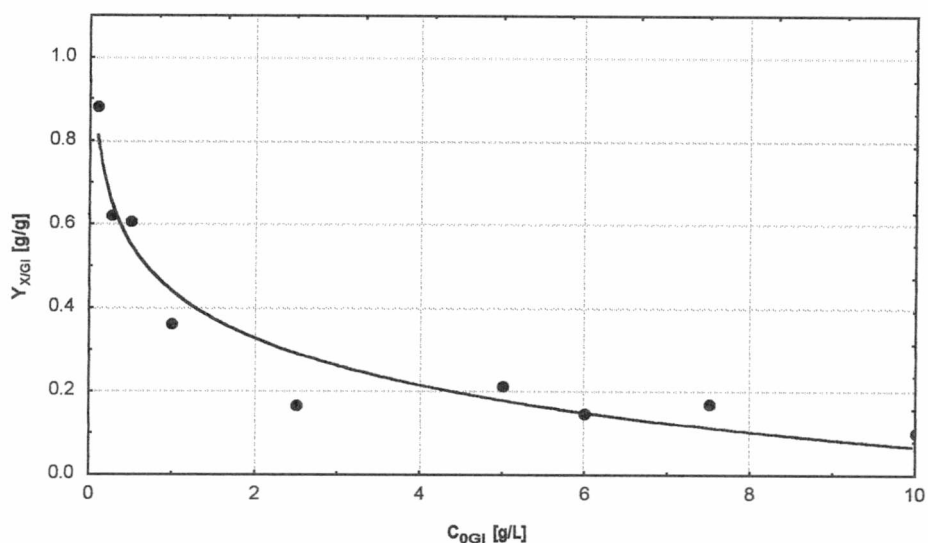
- Wydajność syntezy biomasy względem substratów: glukozy i azotu

Na Rys. 7.2.7 przedstawiono wpływ stężenia początkowego glukozy na współczynniki $Y_{X/Gl}$ w hodowli heterotroficznej. Zaobserwowano, że zarówno współczynnik $Y_{X/Gl}$ jak i $Y_{X/N}$ jest stały w czasie trwania hodowli, natomiast jego wartość zależy od początkowego składu pożywki. Stwierdzono, że wartość współczynnika maleje ze wzrostem początkowego stężenia glukozy, a wartości najniższe przyjmuje przy jej wysokich stężeniach. Gdy stężenie substratu (glukozy) jest wysycające, komórki mniej wydajnie wbudowują substrat w biomasę, czyli ekonomia metabolizmu jest gorsza.

Na Rys. 7.2.8 przedstawiono zależność $Y_{X/N}$ od stężenia początkowego glukozy w hodowli heterotroficznej. Wartość współczynnika rośnie ze wzrostem C_{0GI} , osiągając maksimum przy 1-2.5 g/dm³, a następnie spada. Wartości tego współczynnika są niższe niż w hodowli autotroficznej, wskazując na duże straty azotu - prawdopodobnie przebiega proces denitryfikacji zgodnie z równaniem reakcji [202]:

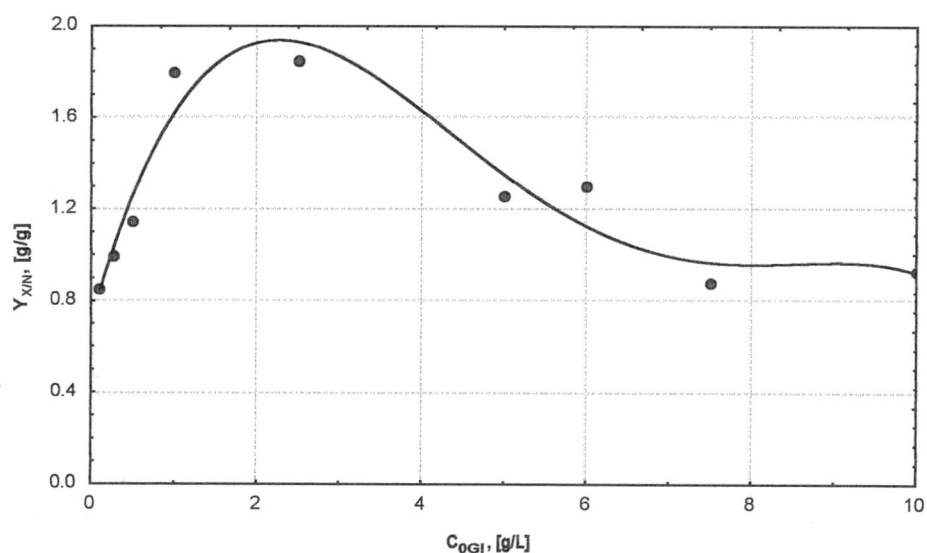


w którym glukoza jest wykorzystywana jako źródło elektronów do redukcji azotanów do azotu gazowego.



Rys. 7.2.7

Współczynniki wydajności biomasy względem glukozy ($Y_{X/GI}$) w funkcji stężenia początkowego glukozy (C_{0GI}), $C_{0N}=0.4$ g/dm³



Rys. 7.2.8

Współczynnik wydajności biomasy względem azotu ($Y_{X/N}$) w funkcji stężenia początkowego glukozy (C_{0GI}); $C_{0N}=0.4$ g/dm³

Wysokie wartości współczynnika oznaczają dużą wydajność syntezy biomasy w stosunku do zużytego substratu, natomiast niskie świadczą o wysokich nakładach na podtrzymanie metabolizmu, czyli na cele energetyczne. Im mniejsza wartość współczynnika, tym mniejsza część azotu jest wbudowywana w biomasę, a więc tym większy udział denitryfikacji. O ile denitryfikacja może być zjawiskiem korzystnym i pożądanym w technologiach oczyszczania ścieków, staje się niekorzystna w przypadku gdy azot azotanowy jest dostarczany jako składnik pożywki. Dlatego przy namnażaniu biomasy na sztucznej pożywce, parametry powinny zostać tak dobrane, by współczynnik przyjmował wartości wysokie, natomiast w technologiach oczyszczania ścieków zawierających duży ładunek azotu: niskie.

W hodowli przy $C_{0GI}=10 \text{ g/dm}^3$, $C_{0N}>0.4 \text{ g/dm}^3$ hodowla rośnie z taką samą szybkością co przy $C_{0N}=0.4 \text{ g/dm}^3$, ale rośnie dłużej czyli końcowe stężenie komórek będzie wyższe (*heterotrof.xls*). Namnażanie komórek przy tak wysokich stężeniach substratów ma jednak poważną wadę, gdyż stopień wbudowywania substratów w biomasę ($Y_{X/S}$) w takich warunkach jest niski i substrat jest tracony: glukoza w postaci CO_2 , N jako N_2 . Dlatego proponuje się namnażanie biomasy przy relatywnie niskim C_{0GI} i C_{0N} , aby współczynniki wydajności były wysokie, a stężenie biomasy satysfakcjonujące.

Współczynniki wydajności biomasy względem substratu są zwyczajowo definiowane jako: przyrost stężenia biomasy przy konsumpcji danego stężenia substratu. Takie podejście jest mylące, gdyż wartość współczynnika „1” nie oznacza całkowitego wbudowania substratu w biomasę, lecz przyrost 1 g biomasy przy ubytku 1 g substratu. W celu precyzyjnego określenia stopnia wbudowania substratu w biomasę, należałoby określić stosunek pierwiastka wbudowanego, do skonsumowanego, czyli wziąć pod uwagę nie tylko masę namnożonej biomasy oraz skonsumowanego substratu, ale również ich skład. O ile zawartość węgla w biomasie (43 %) jest podobna do zawartości węgla w glukozie (40 %) (100 % wbudowania przekłada się na wartość współczynnika 0.93), w przypadku azotu: w biomasie znajduje się 9.5 % N, a substrat przedstawiono w postaci 100 % N - czyli 100 % wbudowania azotu przekłada się na wartość współczynnika $Y_{X/N}$ 10.5. Stopień wbudowania danego pierwiastka w biomasę oraz jego straty można zatem precyzyjnie określić dopiero przy znajomości składu biomasy.

- *Wydajność bioenergetyczna*

Jedynym źródłem energii dla metabolizmu heterotroficznego jest glukoza. Wydajność bioenergetyczna tego metabolizmu będzie zatem liczona jako ilość energii pobrana przez komórki w postaci glukozy w stosunku do masy namnożonych komórek.

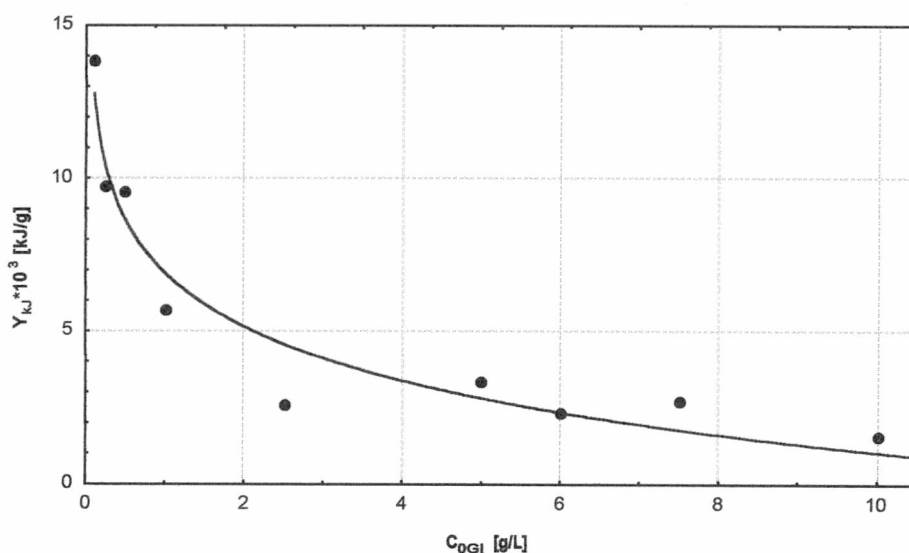
$$Y_{kj}^H = \frac{\Delta X}{\Delta E_{Gl}} \quad (7.2.4)$$

Na Rys. 7.2.9 przedstawiono wpływ początkowego stężenia glukozy na wartość współczynnika Y_{kj}^H . Można zauważyć, że zwiększenie stężenia substratu organicznego powoduje zmniejszenie wartości współczynnika, czyli bardziej „rozrzutną” gospodarkę energetyczną (mniejsza ilość zmagazynowanej energii w stosunku do dostarczonej), podobnie jak przy wysokich natężeniach światła we wzroście autotroficznym: im więcej dostępnego substratu energetycznego, tym gorsza ekonomia jego wykorzystania.

W metabolizmie heterotroficznym, w którym źródłem energii jest tylko glukoza, współczynnik wydajności $Y_{X/Gl}$ będzie związany z Y_{kj}^H następującą zależnością:

$$Y_{kj}^H = \frac{Y_{X/Gl}^H}{\Delta H_{Gl}} \quad (7.2.5)$$

O ile w metabolizmie heterotroficznym współczynnik Y_{kj}^H można powiązać prostą zależnością z $Y_{X/Gl}$, w przypadku metabolizmu miksotroficznego (rozdział 7.3) będzie konieczne uwzględnienie dodatkowego źródła energii jakim jest światło. Korzystając z wyznaczonych wartości Y_{kj}^H oraz Y_{kj}^A możliwe będzie określenie udziału poszczególnych metabolizmów w Y_{kj}^M .



Rys. 7.2.9

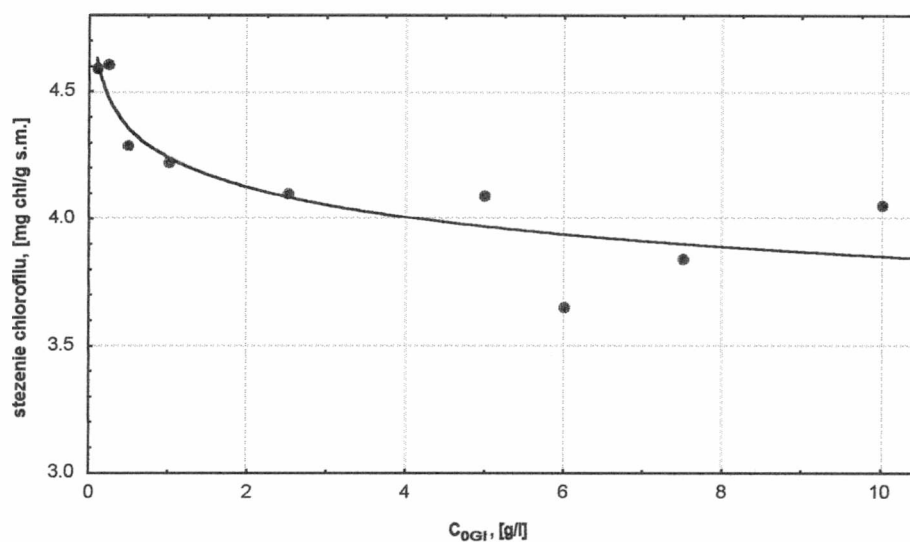
Wpływ stężenia początkowego glukozy (C_{0Gl}) na wartości współczynników wydajności bioenergetycznej (Y_{kj}^H)

- Barwniki fotosyntetyczne

W metabolizmie heterotroficznym do komórek nie dociera światło (nie prowadzą procesu fotosyntezy), ale mimo to biomasa syntezuje chlorofil. W tym przypadku barwnik fotosyntetyczny jest syntezowany „prewencyjnie” dla sytuacji gdy wyczerpaniu ulegnie

substrat organiczny a pojawi się światło. W metabolizmie miksotroficznym (dyskutowanym w rozdziale 7.3), na który składają się autotrofia i heterotrofia, rolę chlorofilu będzie można analizować w oparciu o doświadczenia przeprowadzone w sytuacjach istnienia pojedynczych metabolizmów.

Na Rys. 7.2.10 przedstawiono zależność stężenia chlorofilu od początkowego stężenia glukozy. Obserwowane jest zmniejszenie zawartości barwników fotosyntetycznych ze wzrostem stężenia początkowego glukozy. Wiąże się to ze zmniejszoną potrzebą pozostawienia ewentualności prowadzenia procesu fotosyntezy w przypadku gdy substrat organiczny jest obecny w pożywce w dużym stężeniu.



Rys. 7.2.10

Wpływ stężenia początkowego glukozy na stężenie komórkowe chlorofilu w hodowli heterotroficznej

7.3 Hodowla miksotroficzna

W celu określenia wpływu stężenia glukozy oraz natężenia światła na wzrost *Spirulina* sp., przeprowadzono dwie serie hodowli miksotroficznych: przy różnym początkowym stężeniu glukozy ($0.1\text{--}10\text{ g/dm}^3$) oraz przy różnym natężeniu światła ($8\text{--}65\text{ W/m}^2$) w napowietrzanym fotobioreaktorze mieszalnikowym. Jako bazę zastosowano standardową, mineralną pożywkę typu Zarrouk wzbogaconą w glukozę. Tabele wyników z przeprowadzonych hodowli znajdują się na załączonym do pracy dysku CD-ROM (plik *miksotrof.xls*).

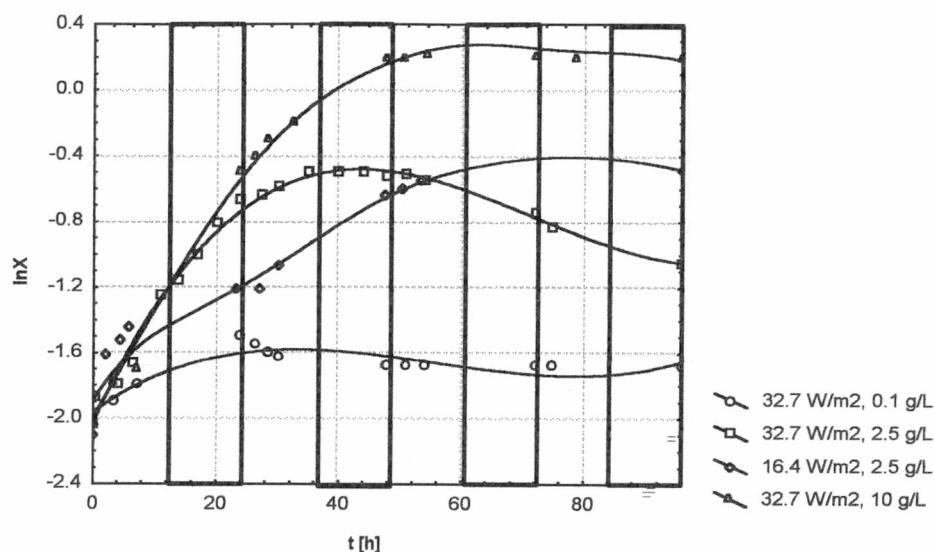
7.3.1 Kinetyka wzrostu mikroorganizmów

- Dane kinetyczne

- Analiza krzywej wzrostu

Na Rys. 7.3.1 przedstawiono przykładowe krzywe wzrostu hodowli miksotroficznej przy $I_{sr}=32.7\text{ W/m}^2$ oraz $C_{0GI}=0.1\text{ g/dm}^3$ i 2.5 g/dm^3 , przy $I_{sr}=16.4\text{ W/m}^2$ i $C_{GI}=2.5\text{ g/dm}^3$ oraz 32.7 W/m^2 i 10 g/dm^3 . Największą szybkość wzrostu odnotowano dla (32.7 W/m^2 , 2.5 g/dm^3 i 10 g/dm^3), ale stężenie końcowe komórek było podobne do hodowli (16.4 W/m^2 , 2.5 g/dm^3), w której faza wzrostu trwała dłużej, ale szybkość wzrostu była mniejsza. W tym przypadku światło powoduje przyspieszenie wzrostu, ale nie prowadzi do zwiększenia końcowego stężenia komórek. Przy niskim stężeniu glukozy (32.7 W/m^2 , 0.1 g/dm^3) stężenie końcowe komórek podobnie jak szybkość wzrostu, są niskie. Wskazuje to, że zarówno natężenie światła jak i stężenie glukozy mają wpływ na szybkość wzrostu.

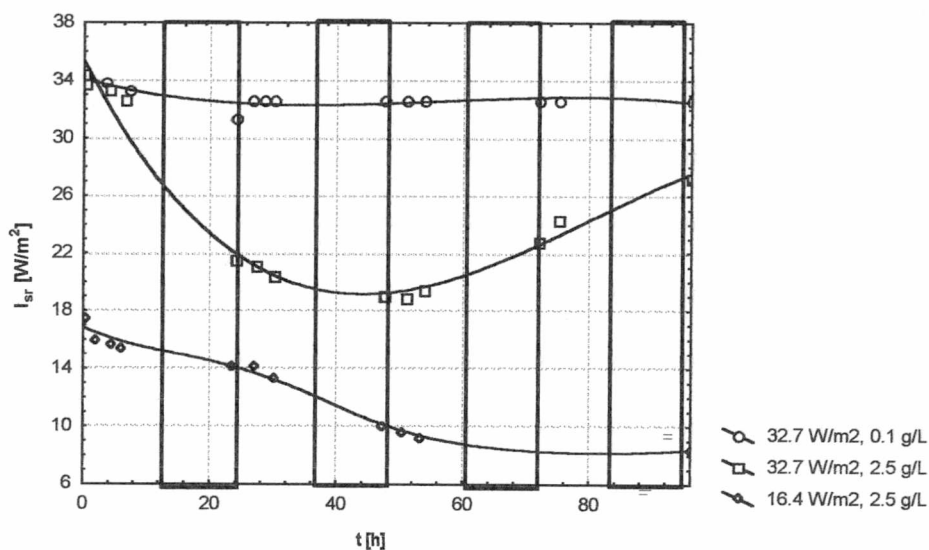
W hodowli autotroficznej stwierdzono istnienie blokady fizjologicznej, nie pozwalającej hodowli na osiągnięcie większego niż 0.5 g/dm^3 całkowitego stężenia komórek (rozdział 7.1.3). W przypadku hodowli miksotroficznej, w badanym zakresie, nie stwierdzono istnienia takiej blokady (Rys. 7.3.1). Możliwe jest jej przesunięcie w kierunku wyższych stężeń komórek. W hodowli, w której zwiększono stężenia substratów (glukozy oraz azotu azotanowego do stężenia odpowiednio 10 g/dm^3 oraz 1.6 g/dm^3) (32.7 W/m^2 , 10.0 g/dm^3 , 1.6 g/dm^3) w stosunku do (32.7 W/m^2 , 2.5 g/dm^3 , 0.40 g/dm^3) komórki rosły z taką samą szybkością, ale rosły dłużej. Końcowe, całkowite stężenie komórek wynosiło 1.4 g/dm^3 . Wskazuje to na zniesienie blokady fizjologicznej w obecności substratu organicznego. Należy również nadmienić, że w hodowli heterotroficznej blokada ta również nie występowała. Wzrost ustaje jako skutek wyczerpania któregoś z substratów.



Rys. 7.3.1

Przykładowe krzywe wzrostu hodowli miksotroficznej

Konsekwencją większego przyrostu biomasy jest większa zmiana średniego natężenia światła (Rys. 7.3.2), niż w hodowli autotroficznej. W przypadku hodowli przy $C_{0GI}=2.5$ g/dm³ natężenie światła zmniejsza się o połowę, w przypadku hodowli (32.7 W/m², 0.1 g/dm³) o kilka procent. W fazie obumierania, konsekwencją zmniejszenia stężenia biomasy jest zwiększenie natężenia światła pod koniec hodowli.

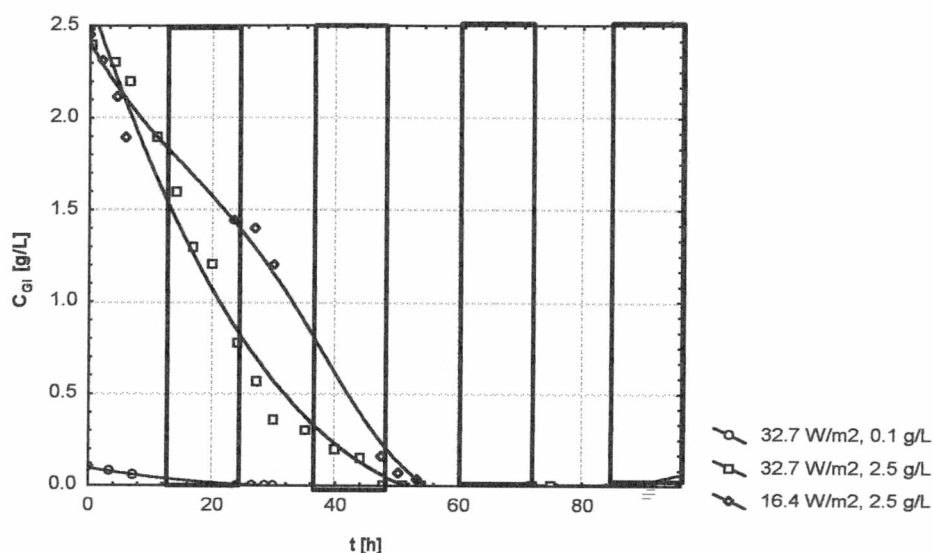


Rys. 7.3.2

Zmiany w średnim natężeniu światła spowodowane przyrostem biomasy

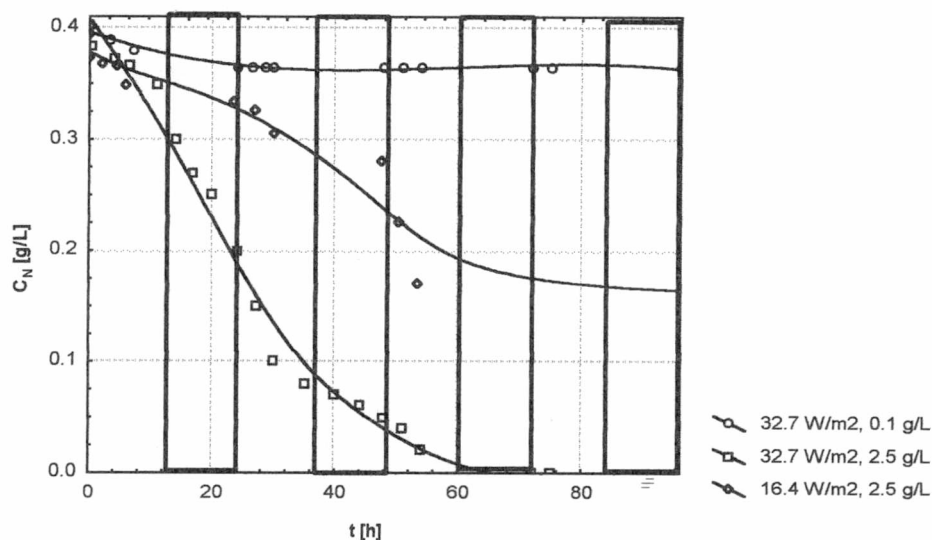
- Analiza zmian stężeń substratów: źródła węgla oraz azotu

Zaobserwowano, że zarówno glukoza (Rys. 7.3.3) jak i azot-azotanowy (Rys. 7.3.4) są konsumowane szybciej przy większym natężeniu światła. W każdej z hodowli glukoza została całkowicie wykorzystana, natomiast azot-azotanowy został całkowicie zużyty tylko w (32.7, 2.5).



Rys. 7.3.3

Stężenie glukozy w przykładowych hodowlach mikstotroficznym

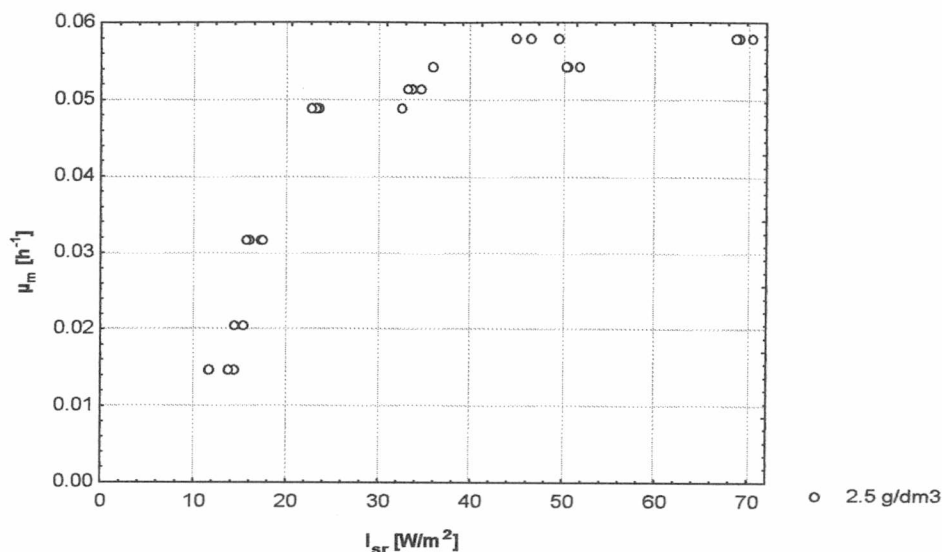


Rys. 7.3.4

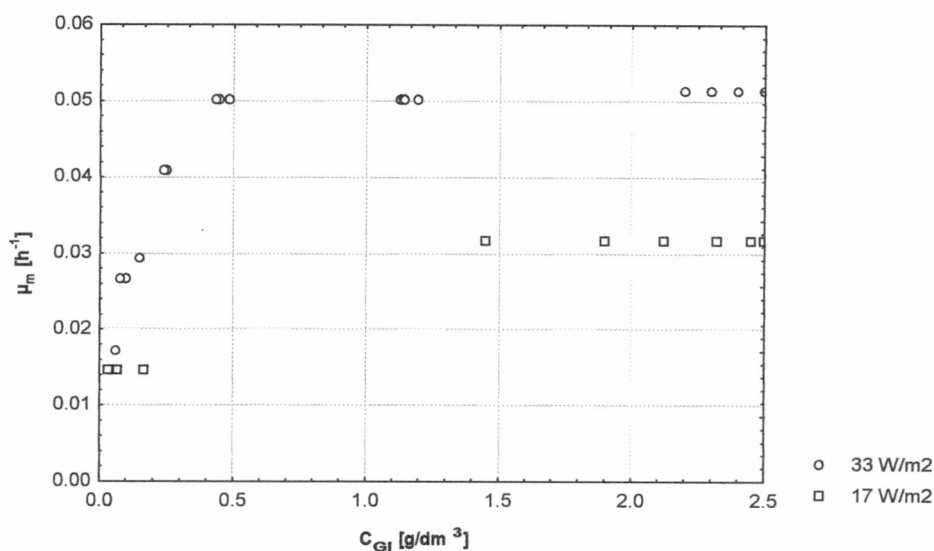
Stężenie azotu-azotanowego w przykładowych hodowlach mikstotroficznym

- Model wzrostu dla hodowli mikstotroficznym

Na Rys 7.3.5a przedstawiono specyficzną szybkość wzrostu w funkcji średniego natężenia światła, a na Rys. 7.3.5b specyficzną szybkość wzrostu w funkcji stężenia glukozy. Stwierdzono, że na wzrost w hodowli mikstotroficznym wpływa zarówno natężenie światła, jak i stężenie glukozy. W przypadku obydwu serii pomiarowych (zmienne I_{sr} oraz zmienne C_{Gl}) w badanym zakresie dla metabolizmu mikstotroficznego, przy wysokich wartościach parametrów nie zaobserwowano inhibicji substratowej (światła - inaczej niż w autotrofii oraz glukozy - podobnie jak w heterotrofii). Specyficzna szybkość wzrostu przyjmuje najwyższe wartości przy natężeniu światła i stężeniu glukozy: $I_{sr} > 35 \text{ W/m}^2$, $C_{0Gl} > 0.5 \text{ g/L}$.



(a)



(b)

Rys. 7.3.5

Specyficzna szybkość wzrostu w hodowli miksotroficznej w funkcji natężenia światła ($\mu_m(t \approx 0)$) (a, $C_{0GI} = 2.5$ g/dm³) i stężenia glukozy (b, $I_{sr} = 33$ oraz 17 W/m²)

Brak obserwowanej fotoinhibicji może mieć różny mechanizm. Jedną z możliwości jest ochronny wpływ glukozy, inną - zwiększenie (w obecności metabolizmu heterotroficznego) wartości natężenia światła w którym hodowla przechodzi w obszar inhibujący wzrost lub też zwiększenie udziału metabolizmu heterotroficznego w obecności oraz ze wzrostem natężenia światła. Literatura również nie stwierdza fotoinhibicji w metabolizmie miksotroficznym. Nie próbowano wyjaśnić natury tego procesu [179-182, 292], ponieważ nie istnieje możliwość badania wpływu światła na składową heterotroficzną miksotrofii w sposób bezpośredni, gdyż sam metabolizm heterotroficzny cechuje właśnie brak światła.

Model wzrostu miksotroficznego powinien uwzględniać dwie zmienne: natężenie światła oraz stężenie glukozy. Opierając się na wynikach doświadczalnych przetestowano szereg modeli matematycznych (addytywnych oraz multiplikatywnych), opisujących wpływ stężenia glukozy oraz natężenia światła na specyficzną szybkość wzrostu.

Na podstawie danych prezentowanych przez Marquez i in. [179-182] początkowo przyjęto, że miksotrofia jest prostą superpozycją auto- i heterotrofii. W celu sprawdzenia zasadności tego założenia porównano doświadczalne μ^M z sumą $\mu^A + \mu^H$ (7.3.1). Symulacja ta nie potwierdziła hipotezy, że metabolizmy auto- i heterotroficzne funkcjonują niezależnie w metabolizmie miksotroficznym. W badanym zakresie natężenia światła nie stwierdzono bowiem zjawiska fotoinhibicji, w związku z czym miksotrofia nie może być prostą sumą auto- i heterotrofii.

$$\mu^M(I, C_{Gl}) \neq \mu^A(I) + \mu^H(C_{Gl}) \quad (7.3.1)$$

Ponieważ krzywe wzrostu (Rys. 7.3.1) nie mają charakteru diauksycznego, obydwa metabolizmy (auto- i hetero-) zachodzą jednocześnie w komórce miksotroficznej. Dlatego przy konstruowaniu modelu należy wziąć pod uwagę, że obydwie składowe procesy miksotroficzne: auto- i heterotrofia funkcjonują jednocześnie w komórce, a zatem muszą się podzielić strukturami subkomórkowymi, w szczególności ogniwem łączącym fotosyntezę z tlenowym rozkładem glukozy jest łańcuch transportu elektronów, którego zadaniem jest m.in. synteza wysokoenergetycznych związków ATP i NADPH [292].

Przy niskich natężeniach światła ($I_{sr} < 20 \text{ W/m}^2$) $\mu^M < \mu^H$, przy wyższych ($I_{sr} > 20 \text{ W/m}^2$) $\mu^M > \mu^H$. Natomiast przy każdym natężeniu światła $\mu^M > \mu^A$. Dodatkowo, zależność μ_M w funkcji I_{sr} ma podobnie postać krzywej łamanej jak $\mu^A = f(I_{sr})$: na wykresie można wyróżnić obszar liniowo zależny od natężenia światła ($0-30 \text{ W/m}^2$) oraz obszar, w którym specyficzną szybkość wzrostu jest stała ($30-72 \text{ W/m}^2$). Światło, zatem ma decydujący wpływ na szybkość wzrostu w hodowli miksotroficznej. Konieczne będzie również uwzględnienie stymulującego wpływu glukozy na wzrost.

W związku z powyższym przyjęto, że specyficzną szybkość wzrostu w metabolizmie miksotroficznym zależy od natężenia światła oraz stężenia glukozy w podobny sposób jak w metabolizmach niezależnych w zakresie $I_{sr} \in (0, 52 \text{ W/m}^2)$, $C_{Gl} \in (0, 2.5 \text{ g/dm}^3)$: odpowiednio auto- i heterotroficznym. Jako podstawę przyjęto metabolizm autotroficzny, który jest modyfikowany (stymulowany) przez glukozę. Założono wysycający charakter wpływu glukozy, podobnie jak w przypadku metabolizmu heterotroficznego, który można opisać równaniem Monoda (7.3.2). Parametry modelowe wyznaczono metodą regresji nieliniowej (*Mathematica 3.0*). Dane doświadczalne opisano równaniem (7.3.2) - Rys. 7.3.6.

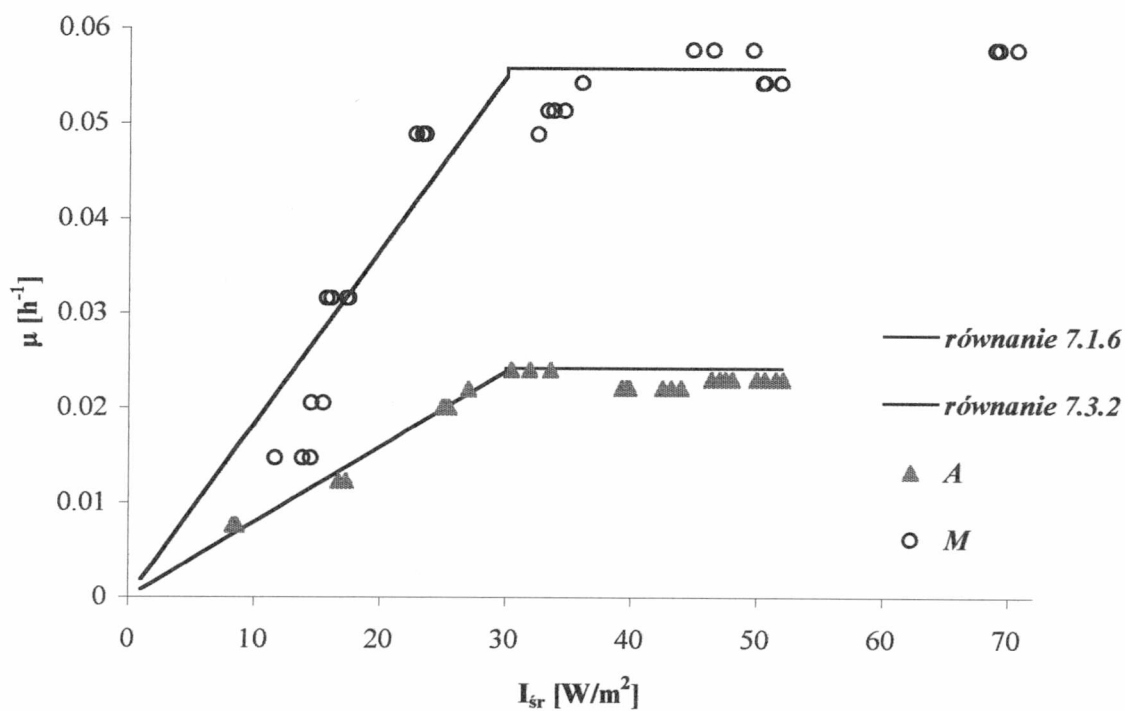
$$\mu_M = f(C_{Gl}) \cdot \mu^A(I) = \frac{a \cdot C_{Gl}}{K_{Gl}^M + C_{Gl}} \cdot \mu^A(I) \quad (7.3.2)$$

$$a = 2.40 h^{-1}$$

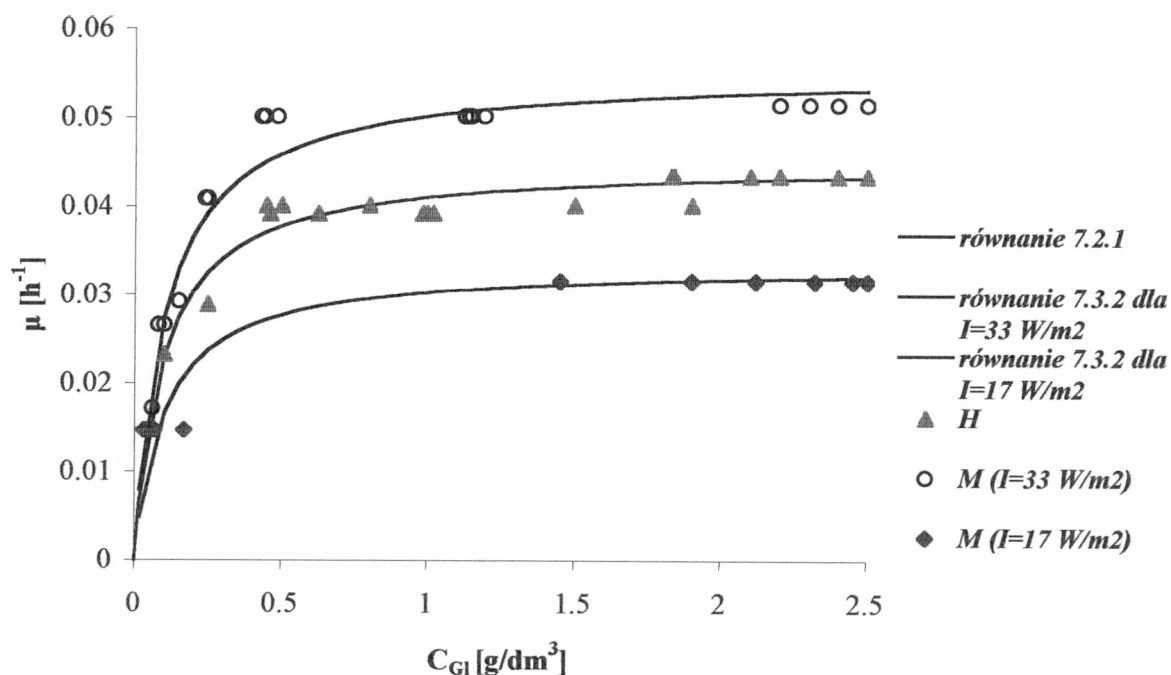
$$K_I^M = 0.101 g / dm^3$$

$$R^2 = 0.970$$

$$\text{dla } I \in (0, 52 \text{ } W / m^2)$$



(a)

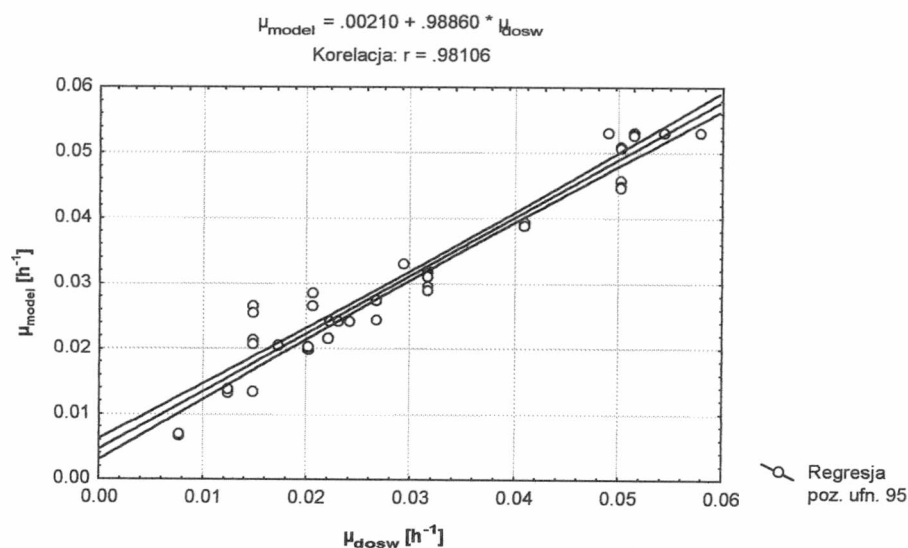


(b)

Rys. 7.3.6

Model w hodowli auto-(7.1.6), hetero- (7.2.2) oraz miksotroficznej (7.3.2) opisujący wpływ natężenia światła (a, $C_{0GI}=2.5 \text{ g/dm}^3$) oraz stężenia glukozy (b, $I_{sr}=17$ oraz 33 W/m^2) na specyficzną szybkość wzrostu.

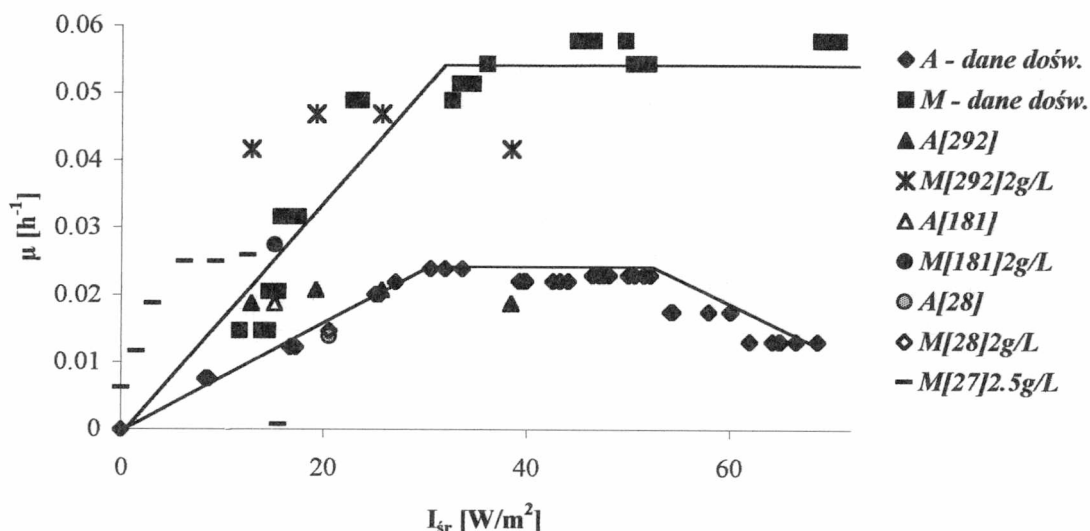
Na Rys. 7.3.7 przedstawiono korelację pomiędzy wynikami doświadczalnymi i modelowymi (0.981).



Rys. 7.3.7

Korelacja pomiędzy wartościami doświadczalnymi i modelowymi

Na Rys. 7.3.8 porównano dane doświadczalne z danymi literaturowymi, dotyczące wpływu światła na specyficzną szybkość wzrostu w metabolizmie auto- i miksotroficznym. Odnotowano podobieństwo własnych danych doświadczalnych oraz danych literaturowych, przy czym dane doświadczalne obejmują pełniejszy zakres natężenia światła.



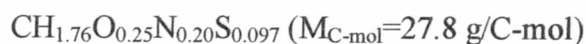
Rys. 7.3.8

Specyficzna szybkość wzrostu w funkcji natężenia światła - porównanie własnych danych doświadczalnych z literaturowymi [27, 28, 181, 292]

7.3.2 Statyka wzrostu mikroorganizmów

- Skład komórek

Analiza elementarna CHONS umożliwiła wyznaczenie składu komórek miksotroficznych:



oraz stopnia redukcji, który jest wyższy niż komórek autotroficznych i heterotroficznych

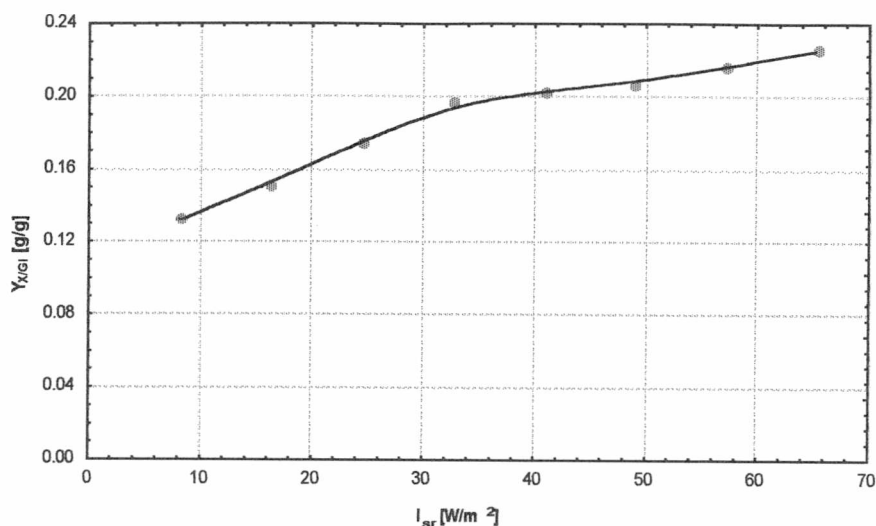
$$\gamma_X=4.47$$

$$Q_X=18.2 \text{ kJ/g}$$

Wynika stąd, że ilość energii zmagazynowana w biomase miksotroficznej jest większa niż w auto- i heterotroficznej. Skład komórek miksotroficznych jest bardzo podobny do komórek heterotroficznych. Stwierdzono nieco większą zawartość tlenu, czyli stopień redukcji oraz entalpia spalania są większe.

- Wydajność syntezy biomasy względem substratów: glukozy i azotu

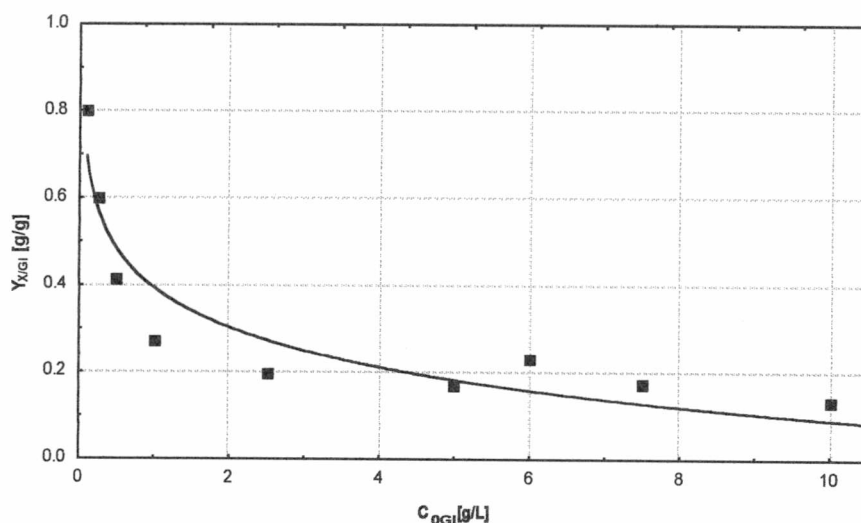
Na Rys. 7.3.9 przedstawiono wpływ natężenia światła na wartość współczynników wydajności biomasy względem glukozy w hodowli miksotroficznej. Im wyższe natężenie światła, tym więcej energii świetlnej otrzymują komórki, a więc glukoza jest wykorzystywana głównie jako substrat materiałowy - część energii na podtrzymanie metabolizmu pochodzi ze światła (Rys. 7.3.9).



Rys. 7.3.9

Współczynniki wydajności biomasy względem glukozy ($Y_{X/Gl}$) w funkcji natężenia światła (I_{sr})

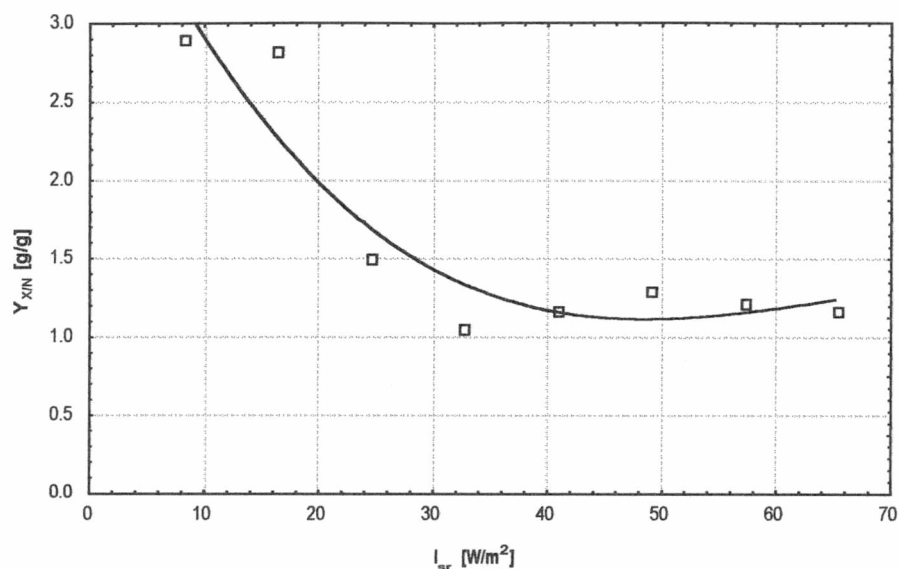
Na Rys. 7.3.10 przedstawiono wpływ stężenia początkowego glukozy na współczynniki $Y_{X/Gl}$ w hodowli miksotroficznej. Współczynnik ten jest maksymalny dla niskich początkowych stężeń glukozy (0.1 g/dm³), a najniższy przy jej wysokich stężeniach. Gdy stężenie substratu (glukozy) jest duże, komórki mniej wydajnie wbudowują substrat w biomasę.



Rys. 7.3.10

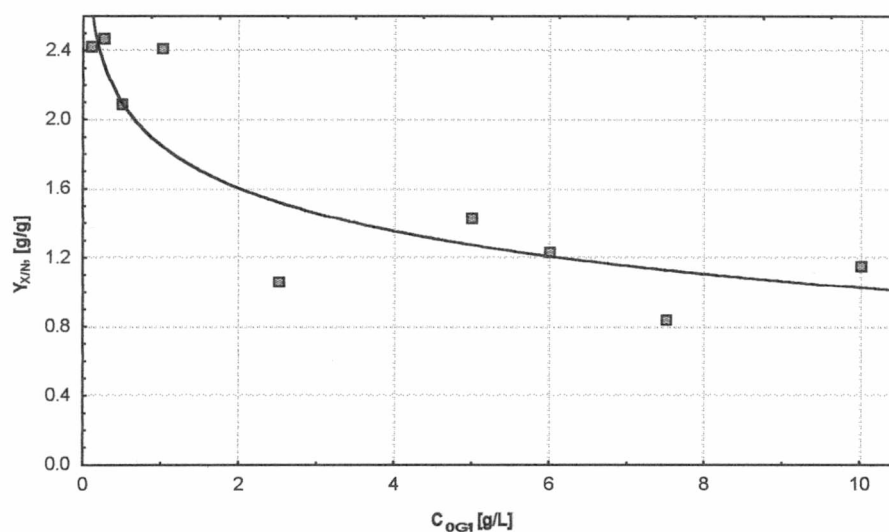
Współczynniki wydajności biomasy względem glukozy ($Y_{X/Gl}$) w funkcji stężenia początkowego glukozy (C_{0Gl})

Stwierdzono, że $Y_{X/N}$ maleje zarówno ze wzrostem natężenia światła (Rys. 7.3.11), jak i początkowego stężenia glukozy (Rys. 7.3.12) - im więcej substratu organicznego i światła, tym więcej strat azotu na drodze denitryfikacji, gdyż proces ten wymaga nakładów energetycznych.



Rys. 7.3.11

Współczynniki wydajności biomasy względem azotu ($Y_{X/N}$) w funkcji natężenia światła (I_{sr}), $C_{0N}=0.4$ g/dm³



Rys. 7.3.12

Współczynniki wydajności biomasy względem azotu ($Y_{X/N}$) w funkcji stężenia początkowego glukozy (C_{0Gl}), $C_{0N}=0.4$ g/dm³

Przy doborze odpowiednich do wzrostu wartości parametrów (natężenia światła i stężenia glukozy) należy się kierować nie tylko szybkością wzrostu, ale również stopniem wykorzystania substratów (mierzonych współczynnikami $Y_{X/Gl}$ i $Y_{X/N}$) oraz jakością komórek (pojemność biosorpcyjna, rozdział 8).

- Wydajność bioenergetyczna

Podczas gdy autotrofy i heterotrofy korzystają z pojedynczego źródła energii (odpowiednio: światło i glukoza), miksotrofy wykorzystują jednocześnie dwa źródła (światło i glukoza). Ilość dostarczonej energii, mierzonej w [kJ] będzie zatem sumą ilości energii dostarczonej w postaci światła i glukozy. Należy zatem odpowiedzieć na pytanie, czy można

dodawać energię o tak różnej naturze oraz rozważyć jaka jest relacja pomiędzy wydajnościami poszczególnych składowych w metabolizmie miksotroficznym.

Marquez [180] wykazał, że współczynnik wydajności bioenergetycznej jest wyższy w hodowli miksotroficznej niż autotroficznej. Według tego autora w komórce *Spirulina* metabolizm miksotroficzny to suma metabolizmów autotroficznego i heterotroficznego, czyli wyznaczona wydajność bioenergetyczna miksotrofii powinna zawierać wydajności składowych metabolizmów (auto- i heterotrofii). Jednak wyniki doświadczalne prezentowane w niniejszej pracy wskazują na mechanizm metabolizmu miksotroficznego, w którym metabolizm autotroficzny jest stymulowany obecnością glukozy.

Wydajność bioenergetyczna miksotrofów definiowana jest jako [180] stosunek energii zmagazynowanej w biomacie do energii dostarczonej w postaci światła oraz substratu organicznego.

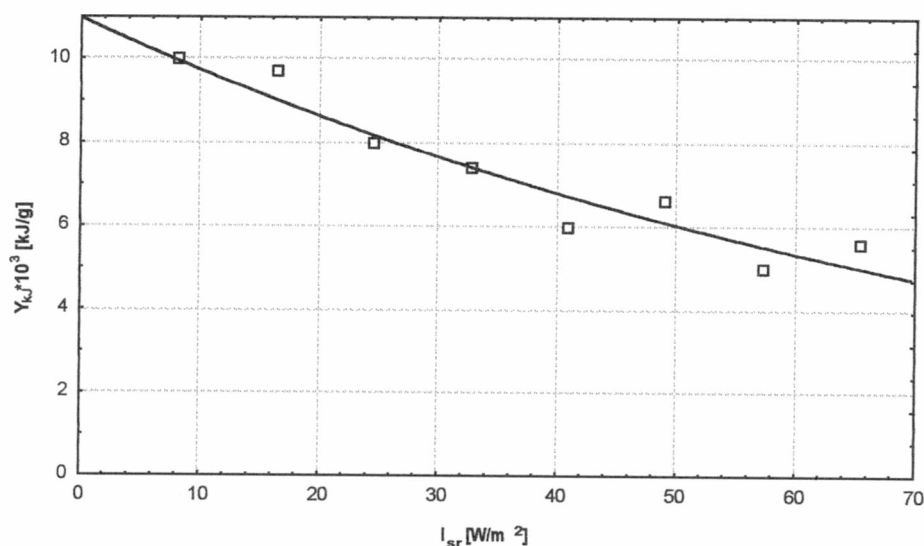
$$Y_{kJ}^M = \frac{\Delta X}{E_{\text{św}} + E_{\text{GI}}} \quad (7.3.3)$$

Zdefiniowana w taki sposób wydajność bioenergetyczna hodowli miksotroficznej pozwoli oszacować efekt ekonomiczny procesu. Na podstawie znajomości rynkowej ceny energii oraz glukozy będzie można określić, przy jakim natężeniu światła i stężeniu glukozy nakłady energetyczne będą najniższe - możliwe będzie również określenie, która hodowla (auto-, hetero- czy mikso-) będzie najatrakcyjniejsza ekonomicznie. Przykładowo, w hodowli (32.7 W/m^2 , 2.5 g/dm^3) ok. 40 % dostarczonej energii pochodzi ze światła, natomiast 60 % z energii chemicznej zmagazynowanej w glukozie. Współczynnik wydajności bioenergetycznej w tej hodowli miksotroficznej (Y_{kJ}^M) wynosi $7.42 \cdot 10^{-3} \text{ g/kJ}$. Aby wyprodukować 1 g komórek należy dostarczyć 100-400 kJ energii w postaci glukozy i światła. Duże natężenie światła i stężenie glukozy prowadzi do niegospodarnego metabolizmu, co znajduje odzwierciedlenie w niskich wartościach Y_{kJ} .

Na Rys. 7.3.13 przedstawiono wpływ natężenia światła, a na Rys. 7.3.14 wpływ stężenia glukozy na współczynniki wydajności bioenergetycznej w hodowli miksotroficznej. Podobnie jak w metabolizmach niezależnych (Rys. 7.3.15 a – auto-, Rys. 7.3.15 b – hetero-) przy wyższym natężeniu światła oraz stężeniu glukozy wydajność wykorzystania energii jest niższa. Stwierdzono, że zależność Y_{kJ}^M w funkcji $I_{\text{śr}}$ ma charakter krzywej wykładniczej (Rys. 7.3.15 a), natomiast w funkcji C_{OGI} potęgowej (Rys. 7.3.15 b). Wydajność bioenergetyczna metabolizmu miksotroficznego jest wyższa niż auto- i heterotroficznego, co opisano funkcją Y_{kJ}^M / Y_{kJA} oraz Y_{kJ}^M / Y_{kJH} , które przyjmują wartości odpowiednio: (od 1 do 4) oraz (od 1 do

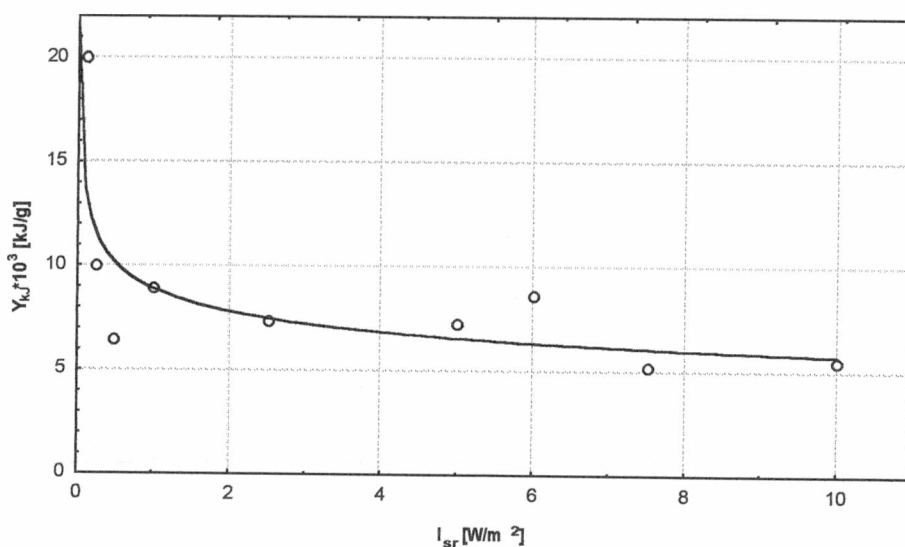
3). W związku z tym w metabolizmie miksotroficznym energia jest wykorzystywana z większą wydajnością.

Wartości współczynników bioenergetycznych uzyskane w niniejszej pracy są podobne do wyznaczonych przez Marquez'a (Rys. 7.3.16) [180] ($4.3\text{--}8.80 \cdot 10^{-3}$ g biomasy/kJ). W literaturze [27, 28, 103, 104, 114] również podaje się, że im wyższe natężenie światła oraz stężenie glukozy, tym niższa efektywność ich wykorzystania. Najwyższą wydajność bioenergetyczną uzyskano przy możliwie niskich natężeniach światła i niskim stężeniu glukozy. Jednak w hodowli przy niskich wartościach tych parametrów stężenie komórek będzie również niskie.



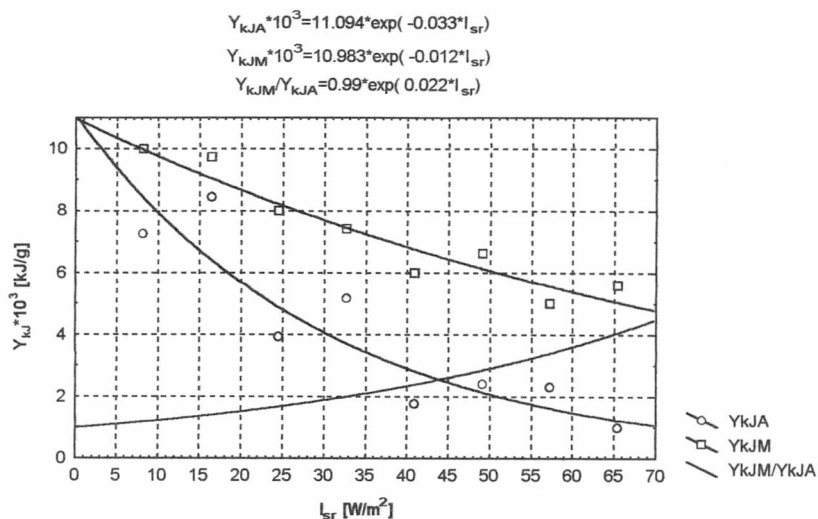
Rys. 7.3.13

Wpływ natężenia światła (I_{sr}) na współczynniki wydajności bioenergetycznej (Y_{kl}) w hodowli auto- i miksotroficzej.

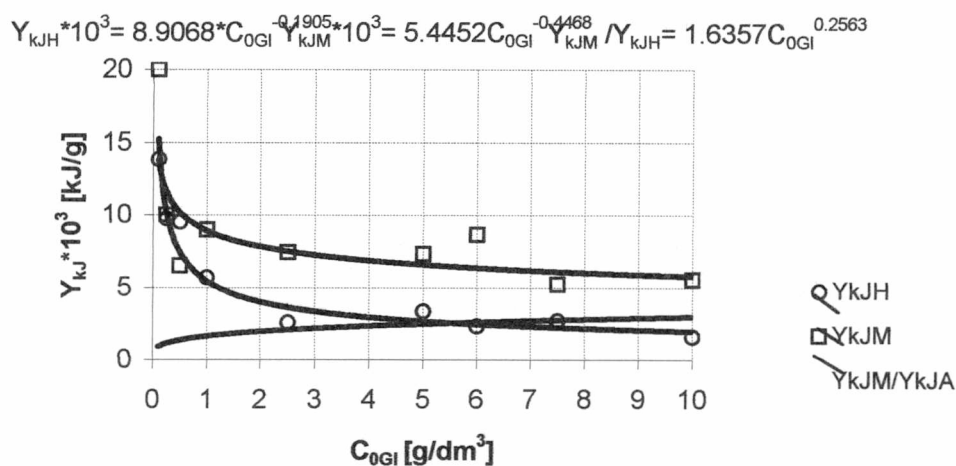


Rys. 7.3.14

Wpływ stężenia początkowego glukozy (C_{0Gl}) na wartości współczynników wydajności bioenergetycznej (Y_{kl}) w hodowli miksotroficzej



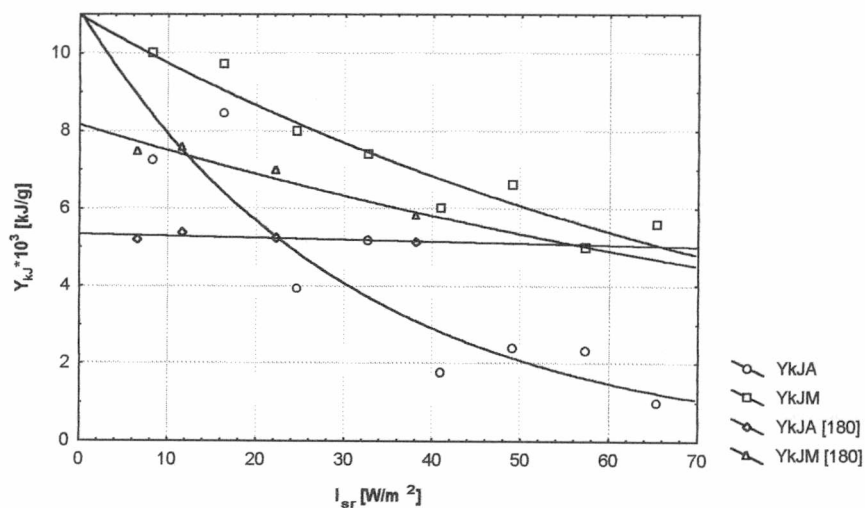
(a)



(b)

Rys. 7.3.15

Wpływ parametrów hodowli: natężenia światła (a) oraz stężenia glukozy (b) na współczynniki bioenergetyczne w hodowli auto- hetero- oraz miksotroficznej



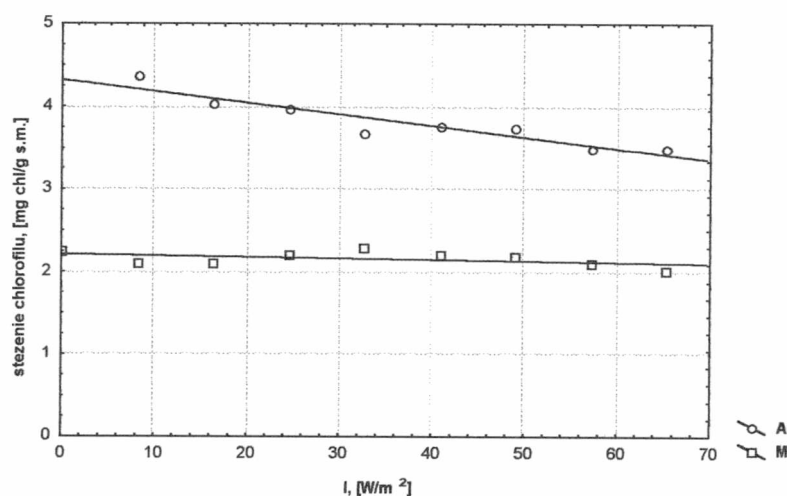
Rys. 7.3.16

Współczynnik wydajności bioenergetycznej w porównaniu do danych uzyskanych przez Marquez'a [180]

- Barwniki fotosyntetyczne

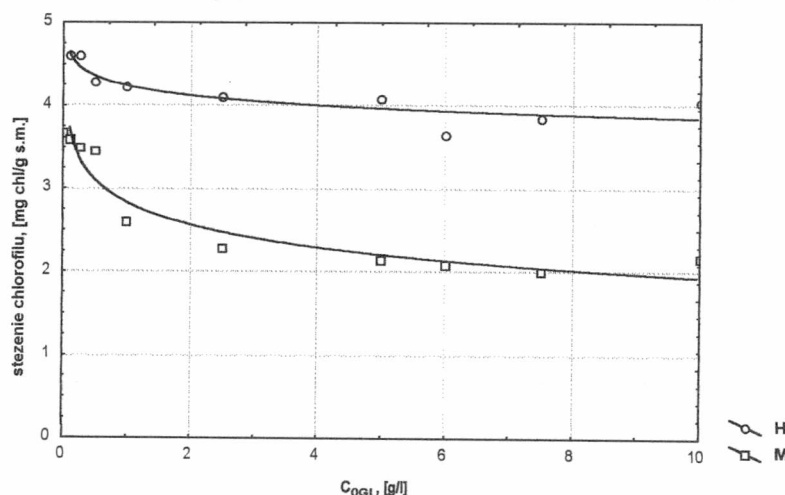
W przypadku wszystkich typów komórek (auto-, hetero- i miksotroficznych) zaobserwowano, że zawartość barwników fotosyntetycznych jest funkcją zarówno natężenia światła jak i stężenia glukozy (Rys. 7.3.17-18). Najwyższa zawartość barwników fotosyntetycznych ma miejsce przy niskim natężeniu światła i glukozy.

Vonshak [292] sugeruje, że zawartość pigmentów jest taka sama, niezależnie od metody wzrostu czy od natężenia światła [292]. Jednak Marquez [180] wykazał, że zmiany w obu hodowlach (autotroficznej i miksotroficznej) były lepiej skorelowane z natężeniem światła niż z formą metabolizmu. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można wnioskować, że zawartość barwników fotosyntetycznych zależy od natężenia światła, ale tylko w hodowli autotroficznej. W miksotroficznej jest stała, niższa w porównaniu do autotroficznej. Zależy również od stężenia substratu organicznego: spada ze wzrostem C_{0GI} .



Rys. 7.3.17

Wpływ natężenia światła na stężenie chlorofilu w komórkach w hodowli auto- i miksotroficznej



Rys. 7.3.18

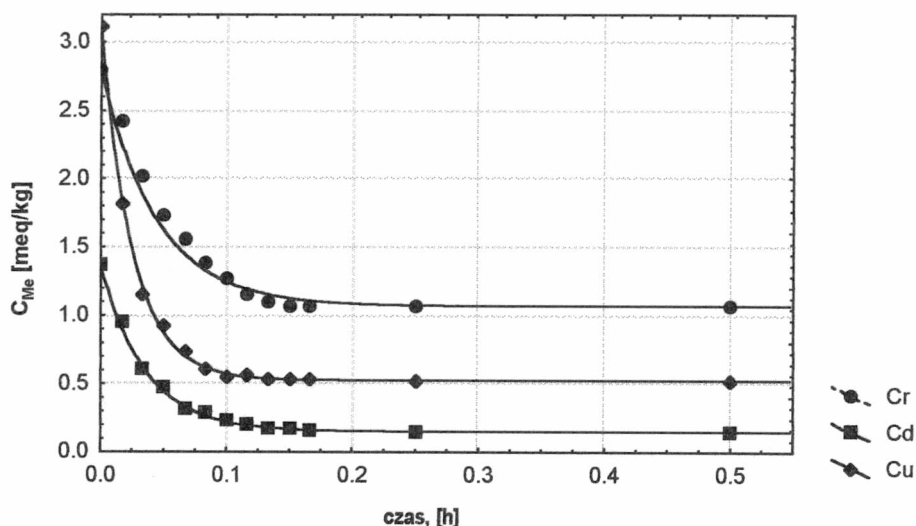
Wpływ stężenia początkowego glukozy na stężenie chlorofilu w komórkach w hodowli hetero- i miksotroficznej

8. BIOSORPCJA

8.1 Kinetyka biosorpcji jonów metali ciężkich

Biosorpcja jest uważana za proces szybki [3, 29, 60]. Stan równowagi zostaje osiągnięty po upływie kilku minut. Doświadczenia obejmowały biosorpcję na komórkach zawieszonych w wodzie dejonizowanej i jony metali ciężkich, nie posiadających aktywności metabolicznej. Wówczas proces akumulacji jonów metalu wewnątrz komórki nie zachodzi. Doświadczenia nad usuwaniem jonów metali ciężkich z roztworów w czasie (Rys. 8.1.1) wskazują, że biosorpcja jest procesem równowagowym, w którym stan równowagi zostaje osiągnięty po ok. 10 minutach. Jony są związane z biomasą trwale: stężenie jonów metalu pozostaje niezmienione przez 100 h.

Zaobserwowano, że proces biosorpcji przebiega zgodnie z kinetyką I-rzędu (reakcja równowagowa) (Rys. 8.1.1). Wyznaczono stałe szybkości procesu (biosorpcji: k_1 oraz desorpcji: k_{-1}). Wartości stałych k_1 przyjmują wartości w zakresie 14-33 h^{-1} , natomiast k_{-1} : 3-8.7 h^{-1} (Tabela 8.1.1). Podobieństwo wartości stałych szybkości wynika, jak założono, z identycznego mechanizmu procesu - jony te są podobnej wielkości, czyli podobnej ruchliwości. Różnica w wartości stałych wynika prawdopodobnie z różnego powinowactwa powierzchni komórki do danego jonu.



Rys. 8.1.1
Kinetyka usuwania jonów Cr^{3+} , Cd^{2+} oraz Cu^{2+} na drodze biosorpcji przez formę autotroficzną *Spirulina* sp.

Tabela 8.1.1

Stałe szybkości procesu biosorpcji i desorpcji [h^{-1}]			
	Cr^{3+}	Cd^{2+}	Cu^{2+}
k_1	14.0	24.97	33.3
k_{-1}	8.67	3.06	6.75

8.2 Statyka procesu biosorpcji

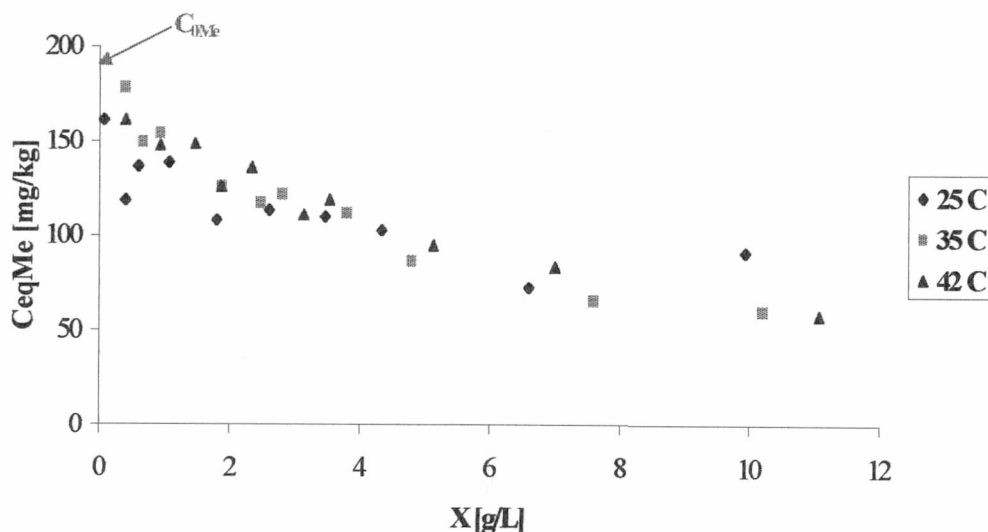
W procesie biosorpcji wiązanie jonów metali ciężkich (przy danym C_0) zależy od stężenia jonów w roztworze ($C_{Me}(t)$), stężenia biomasy (X), pojemności biosorpcyjnej ($q(t)$) oraz pozostałych czynników, które zależą od mechanizmu procesu (np. temperatury, pH) [243, 43, 279, 282, 288].

- Wpływ temperatury

W literaturze najczęściej przedstawia się proces biosorpcji (podobnie jak adsorpcji) jako zjawisko silnie zależne od temperatury [1, 6, 29, 55, 57, 79, 161]. Na Rys. 8.2.1 przedstawiono wpływ temperatury na wydajność biosorpcji przez *Spirulina sp.* W badanym zakresie temperatur (25-42 °C - nie testowano szerszego zakresu, gdyż mogłoby to doprowadzić do destrukcji powierzchni biomasy) wpływ ten był niezauważalny (Rys. 8.2.1). Słaby wpływ temperatury może świadczyć o innym niż adsorpcja fizyczna mechanizmie procesu.

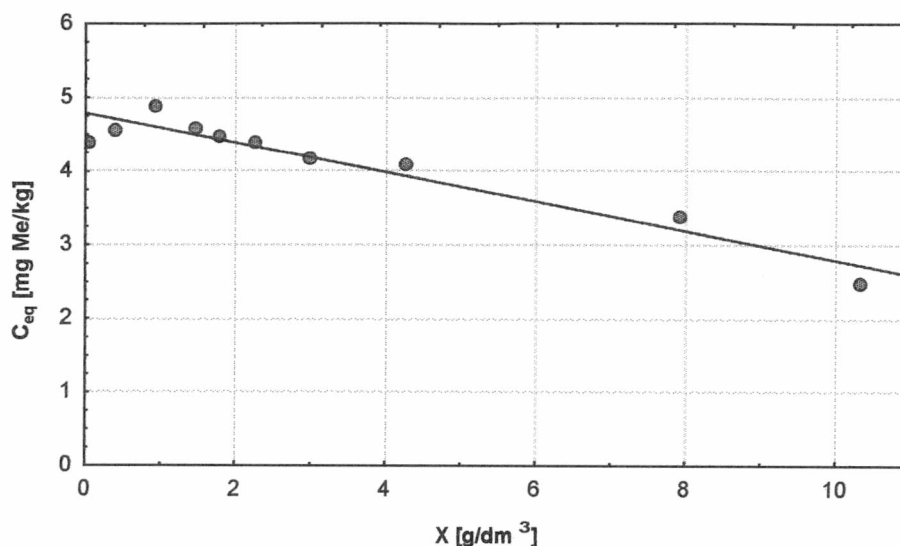
- Wpływ stężenia sorbenta

W celu określenia wpływu stężenia sorbenta na biosorpcję, przeprowadzono doświadczenia sorpcyjne przy różnym stężeniu komórek (Rys. 8.2.1-3). Stężenie komórek (przy danym C_{0Me}) decyduje o pojemności biosorpcyjnej oraz stężeniu równowagowym jonów metalu. Im wyższe stężenie komórek, tym mniejsze stężenie równowagowe jonów metalu w roztworze i tym mniejsza pojemność biosorpcyjna. Stężenie *Spirulina sp.* w dalszych doświadczeniach ustalono jako 0.5-1 g/dm³.



Rys. 8.2.1

Wpływ temperatury oraz stężenia sorbenta na proces biosorpcji (jony kadmu).

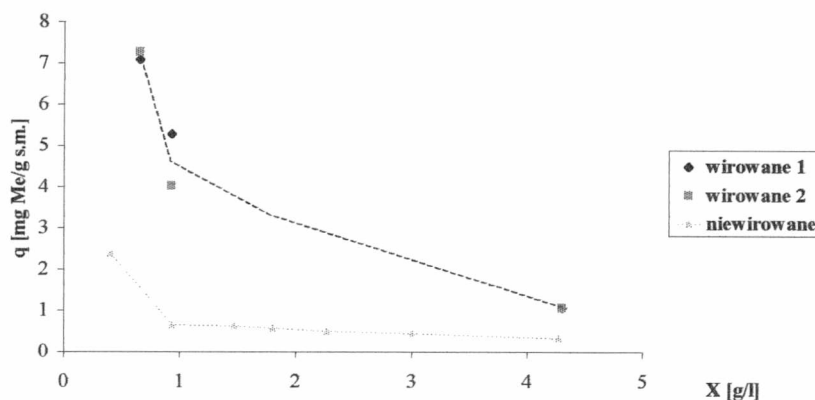


Rys. 8.2.2

Pojemność biosorpcji jonów chromu jako funkcja stężenia biosorbenta; $C_{0Me}=5,7$ mg/kg

- Wpływ wirowania

Uważa się, że komórki rozbite [281] (np. na drodze wirowania) mają większą pojemność biosorpcyjną, gdyż wówczas wewnątrz komórki (będące, podobnie jak ściana komórkowa, biopolimerem), wchodzi również w kontakt z roztworem. Stwierdzono, że w istocie komórki poddane wirowaniu mają większą pojemność wiązania kationów niż komórki nie poddane wirowaniu (Rys. 8.2.3). Rozbijanie komórek wiąże się jednak z wylaniem składników komórkowych i zanieczyszczeniem roztworu.



Rys. 8.2.3

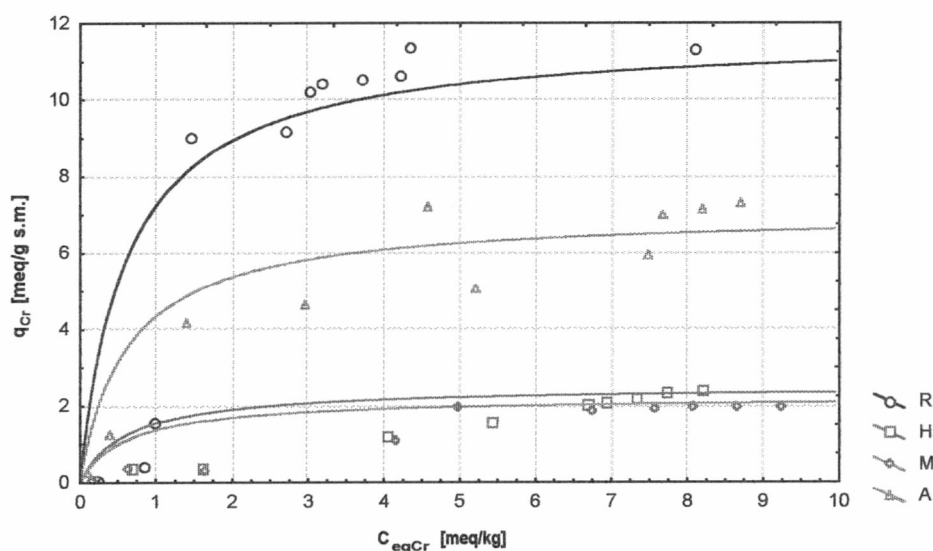
Wpływ wirowania oraz stężenia biomasy na pojemność biosorpcyjną komórek w stosunku do jonów miedzi; wirowanie 1 - czas wirowania 10 minut, wirowanie 2 - 20 minut.

- Wpływ stężenia jonów metalu

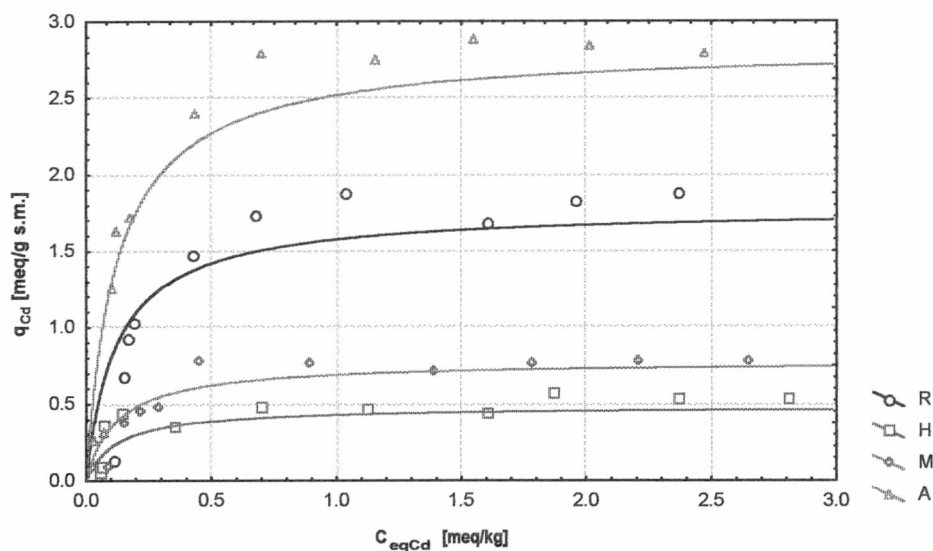
Doświadczenia nad biosorpcją przeprowadzono dla trzech jonów metali Cr^{3+} , Cd^{2+} oraz Cu^{2+} oraz czterech morfologicznych form *Spirulina*. Jony te różnią się wartościowością oraz toksycznością. Podczas gdy jony Cu^{2+} oraz Cr^{3+} uważane są za mikroelementy (ich

niedobór jest równie niebezpieczny co nadmiar), jony Cd^{2+} są wysoce toksyczne (nie stwierdzono żadnej pozytywnej roli).

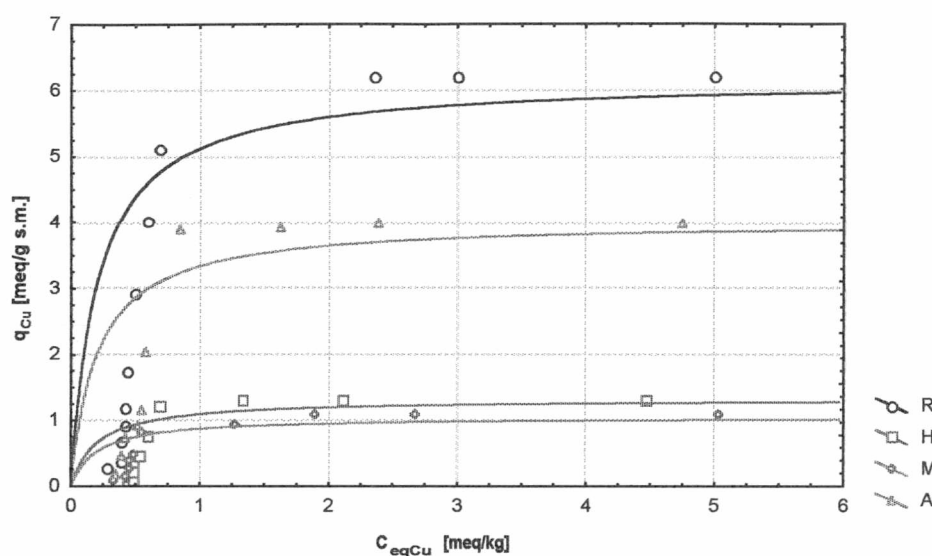
Przetestowano stosowalność różnych modeli (Tabela 2.2.3) do opisu stanów równowagowych biosorpcji jonów metali ciężkich przez *Spirulina sp.* dla poszczególnych form morfologicznych: R (lifoilizowana), H (heterotroficzna), M (miksotroficzna), A (autotroficzna). Zadowalające wyniki uzyskano dla izotermy Langmuira (Rys. 8.2.4). Wyznaczono parametr modelowy $q_{\max}$ (maksymalna pojemność biosorpcyjna), parametr $b=k_1/k_{-1}$ wyznaczono na podstawie doświadczeń kinetycznych (Tabela 8.2.1).



(a)



(b)



(c)

Rys. 8.2.4

Izoterma Langmuira jonów Cr^{3+} (a), Cd^{2+} (b), Cu^{2+} (c) (w temperaturze 35 °C, pH 7) poszczególnych form morfologicznych *Spirulina* sp.

Tabela 8.2.1

Parametry modelowe izotermy Langmuira

	Cr^{3+}		Cd^{2+}		Cu^{2+}	
	$q_{\max}$	b	$q_{\max}$	b	$q_{\max}$	b
	[meq/g]		[meq/g]		[meq/g]	
R	10,7	1.62	1,77	8.16	6,17	4.93
H	2,50	1.62	0,482	8.16	1,32	4.93
M	2,22	1.62	0,775	8.16	1,05	4.93
A	7,03	1.62	2,83	8.16	4,02	4.93

Na podstawie wyznaczonego parametru modelu Langmuira $q_{\max}$, określono maksymalną pojemność biosorpcyjną (Tabela 8.2.2). Stwierdzono, że formy morfologiczne znacznie różnią się zależnością pojemności biosorpcyjnej od stężenia równowagowego jonu metalu w roztworze. Liofilizat *Spirulina* posiada największą pojemność biosorpcyjną w stosunku do Cr^{3+} (185 mg/g) oraz Cu^{2+} (196 mg/g), natomiast fotoautotroficzna forma dla Cd^{2+} (159 mg/g).

Zaskakujące jest, że komórki tego samego szczepu *Spirulina*, wyhodowane w różnych warunkach świetlnych i glukozowych, posiadają tak różną charakterystykę biosorpcyjną. Przykładowo, 1 g komórek M może wiązać 38.5 mg Cr^{3+} , natomiast formy A 122 mg. Generalnie, gorszą charakterystykę biosorpcyjną posiadają formy H i M, których maksymalna pojemność biosorpcyjna jest średnio 3,5 razy niższa niż formy R i A (Tabela 8.2.3).

Tabela 8.2.2
Maksymalne pojemności biosorpcyjne q_{max} [mg Me/g s.m.] poszczególnych form morfologicznych *Spirulina sp.* (wyznaczone na podstawie izotermy Langmuira)

	Cr	Cd	Cu
R	185.47	99.47	195.90
H	43.33	27.09	42.01
M	38.48	43.56	33.30
A	121.85	159.05	127.64

Mając na uwadze różne zdolności biosorpcyjne form morfologicznych, logicznym wnioskiem będzie, że przy różnych parametrach hodowli, ściana komórkowa mikroalg będzie posiadać różną charakterystykę biosorpcyjną, czyli różny skład.

8.3 Powierzchnia sorpcyjna komórek

Przez wiele lat uważano, że w procesie biosorpcji jony metalu wiążą się do rozwiniętej powierzchni sorpcyjnej biosorbenta na drodze adsorpcji [79, 125, 237]. Z reguły, wielkości powierzchni tej nie oznaczano, a ponieważ dane doświadczalne można było opisać z powodzeniem przy pomocy izoterm adsorpcji - nie wniano w szczegółowy mechanizm procesu i utożsamiano biosorpcję z adsorpcją fizyczną.

Przed przystąpieniem do badań, na podstawie doniesień literaturowych [79, 125, 237] założono, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za właściwości biosorpcyjne komórek jest wielkość ich powierzchni. Jeżeli proces biosorpcji odbywa się na powierzchni mikroalg i poszczególne formy morfologiczne różnią się jej wielkością, to powierzchnia adsorpcyjna powinna być proporcjonalna do maksymalnej pojemności biosorpcyjnej. Na tej podstawie można postulować istnienie korelacji pomiędzy powierzchnią sorpcyjną a pojemnością biosorpcyjną: im wyższa powierzchnia tym wyższe q_{max} .

Oznaczono powierzchnię adsorpcyjną (metodą adsorpcji błękitu metylenowego) komórek *Spirulina sp.* Nieoczekiwanie okazało się, że udział adsorpcji fizycznej w mechanizmie biosorpcji był niewielki. Powierzchnia adsorpcyjna była na tyle mała (poniżej $1 \text{ m}^2/\text{g s.m.}$), że teoretycznie obliczona na podstawie promienia jonowego maksymalna pojemność adsorpcji (przy założeniu monowarstwy), wynosiła 2-7 mg/g (Tabela 8.3.1-2), co jest wartością znacznie niższą od obserwowanej pojemności biosorpcyjnej. Okazało się również (zgodnie z oczekiwaniami), że powierzchnia adsorpcyjna zależy od formy morfologicznej alg.

W Tabeli 8.3.1 przedstawiono zestawienie porównawcze maksymalnej pojemności biosorpcyjnej (q_{max}) poszczególnych form *Spirulina sp.* w stosunku do jonów Cr^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} oraz odpowiednio, powierzchni adsorpcyjnych (A). Wykazano, że poszczególne formy

mikroalg posiadają różne powinowactwo do każdego z badanych jonów metalu. Biorąc pod uwagę maksymalną pojemność biosorpcyjną ($q_{\max}$) i zakładając wiązanie metalu w monowarstwie, obliczono powierzchnię jaką zajmują jony Cr^{3+} na powierzchni komórki autotroficznej. Wartość ta wynosi 21 m^2 . Wynika stąd, że należy rozgraniczyć powierzchnię adsorpcyjną od powierzchni zajmowanej przez jon metalu, związany na drodze innego mechanizmu, gdyż jon powinien zajmować 25-krotnie większą powierzchnię (lub wiązać się w 25 warstwach, co wydaje się niemożliwe). Powierzchnia adsorpcyjna jest bowiem na tyle niska, iż można wnioskować, że adsorpcja stanowi niewielki udział (ok. 5 %) w mechanizmach składających się na proces biosorpcji (Tabela 8.3.3).

Biomasa autotroficzna i liofilizowana charakteryzują się największą powierzchnią (ok. $1 \text{ m}^2/\text{g}$ suchej masy). Forma miksotroficzna i heterotroficzna posiadają bardzo zbliżoną powierzchnię, mniejszą niż formy A i R, co sugeruje, że formy te są bardzo podobne do siebie.

Tabela 8.3.1

Powierzchnia adsorpcyjna komórek (oznaczona metodą adsorpcji błękitu metylenowego), maksymalna pojemność biosorpcyjna poszczególnych form Spirulina sp. (a) oraz liczba moli jonów na powierzchni adsorpcyjnej 1 m^2 komórek (b)

forma <i>Spirulina</i> <i>sp.</i>	Cr		Cd		Cu	
	$q_{\max}$	A	$q_{\max}$	A	$q_{\max}$	A
	[meq Me/g s.m.]	[m^2/g]	[meq Me/g s.m.]	[m^2/g]	[meq Me/g s.m.]	[m^2/g]
R	10.7	0.997	1.77	0.776	6.17	0.967
H	2.50	0.339	0.482	0.348	1.32	0.421
M	2.22	0.343	0.775	0.369	1.05	0.369
A	7.03	0.834	2.83	1.23	4.02	0.967
(b)						
	meq/ m^2		Odch. St.	Korelacja	Wartość P	
Cr^{3+}	8.25		1.84	0.983	0.017	
Cd^{2+}	2.02		0.43	0.995	0.005	
Cu^{2+}	4.13		1.60	0.932	0.068	

Tabela 8.3.2

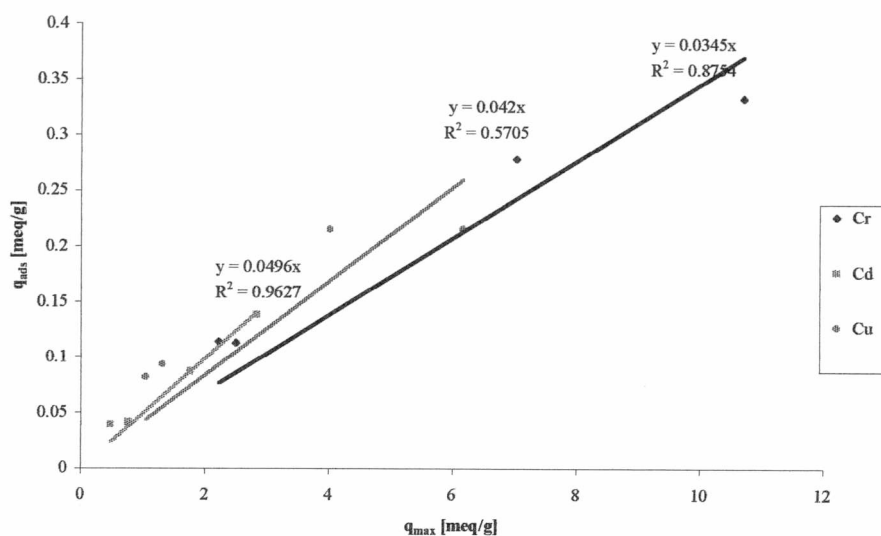
Promienie jonowe kationów metali, powierzchnie jakie zajmują oraz ilość jonów związanych przez daną formę mikroalg na jednostkę powierzchni sorpcyjnej

kation	promień jonowy [Å]	powierzchnia jaką zajmuje 1 jon [m^2]	masa 1 jonu [g]	masa jonów wiązana przez 1 m^2 w monowarstwie [mg]
Cr^{3+}	0,69	$1,50 \cdot 10^{-20}$	$8,63 \cdot 10^{-23}$	5,78
Cd^{2+}	0,97	$2,95 \cdot 10^{-20}$	$1,87 \cdot 10^{-22}$	6,32
Cu^{2+}	0,69	$1,50 \cdot 10^{-20}$	$1,05 \cdot 10^{-22}$	7,05

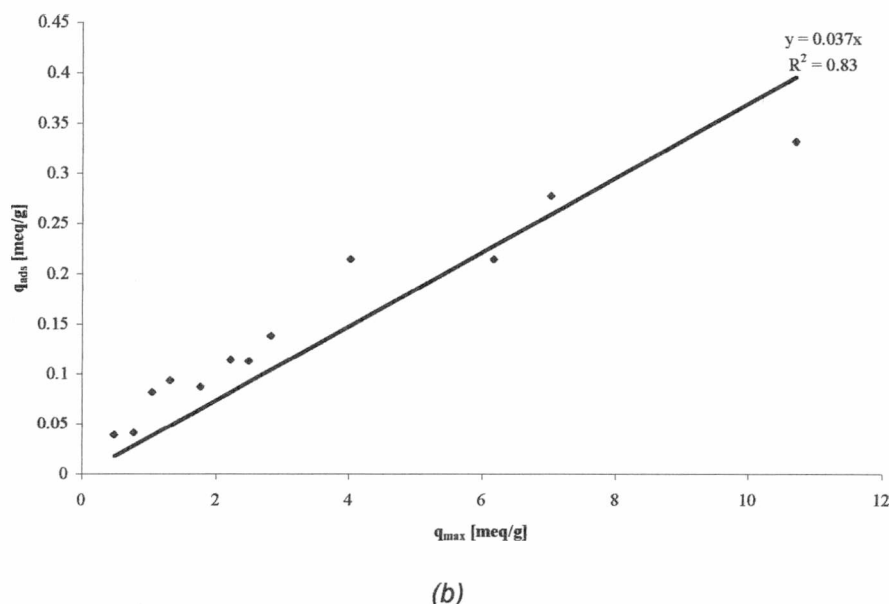
Tabela 8.3.3
Pojemność adsorpcyjna (q_{ads}) oraz udział adsorpcji w procesie biosorpcji (R_{ads})

forma biomasy	Cr^{3+}		Cd^{2+}		Cr^{3+}	
	q_{ads} [mg/g]	R_{ads} [%]	q_{ads} [mg/g]	R_{ads} [%]	q_{ads} [mg/g]	R_{ads} [%]
R	5,76	3,10	4,90	4,93	6,82	3,48
H	1,96	4,52	2,20	8,12	2,97	7,07
M	1,98	5,14	2,33	5,35	2,60	7,81
A	4,85	3,98	7,77	4,89	6,82	5,34

Stwierdzono, że udział pojemności adsorpcyjnej (obliczonej na podstawie znajomości powierzchni adsorpcyjnej - metodą błękitu metylenowego, przy założeniu adsorpcji w monowarstwie) w całkowitej pojemności biosorpcyjnej jest taki sam dla każdej formy morfologicznej ($q_{max}=a \cdot A$, a-udział adsorpcji w biosorpcji) komórek i zależy od rodzaju jonu (Rys. 8.3.1 a) (Cr 3.45 %, Cd 4.96 %, Cu 4.20 %), a średnio wynosi 3.7 % (Rys. 8.3.1 b) Pojemność adsorpcyjna jest zatem proporcjonalna do całkowitej pojemności biosorpcyjnej, a powierzchnia geometryczna komórek jest sumą powierzchni adsorpcyjnej (o powinowactwie do błękitu metylenowego) oraz innej powierzchni, na której znajdują się miejsca wiążące jony metali. Oznacza to, że jednostka powierzchni sorpcyjnej komórek posiada taki sam udział powierzchni adsorpcyjnej (3.7 % powierzchni całkowitej), natomiast jednostka masy komórek różnych morfologicznie posiada różną powierzchnię. Jednak jakość tej powierzchni jest taka sama. Świadczy to o identycznym składzie powierzchni ściany komórkowej mikroalg, ale o różnym jej rozwinięciu (upakowaniu) w jednostce masy sorbenta.



(a)

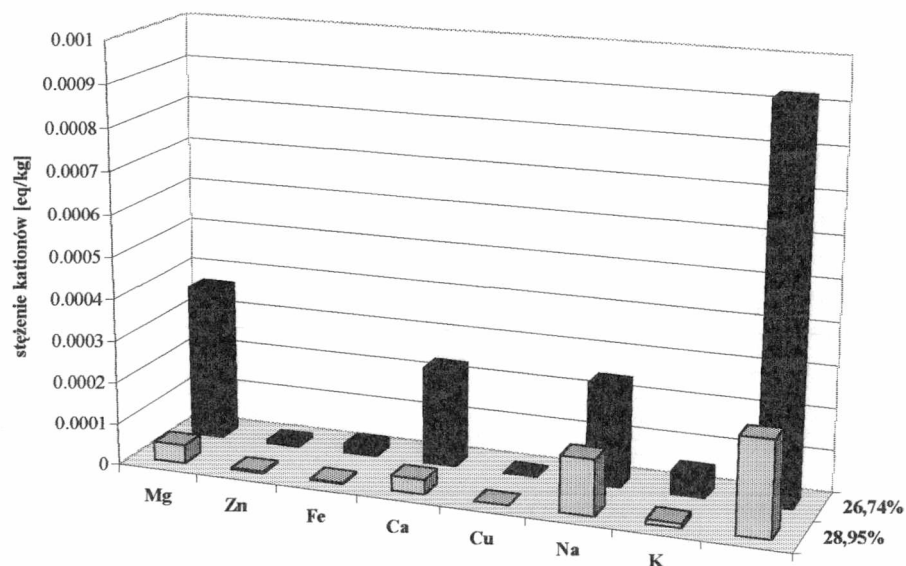


Rys. 8.3.1
 Udział pojemności adsorpcyjnej w biosorpcyjnej

8.4 Mechanizm procesu biosorpcji

Badania wykazały słaby wpływ temperatury oraz niski udział adsorpcji w procesie biosorpcji. Mechanizmem biosorpcji prowadzonej przez *Spirulina sp.* zatem nie jest adsorpcja fizyczna.

Przeprowadzono analizę składu pierwiastkowego roztworu po procesie biosorpcji, która wykazała obecność kationów (które nie znajdowały się w roztworze przed procesem) (Rys. 8.4.1), a stanowiły 27-29 % równoważników usuniętych jonów metali ciężkich. Jony te musiały pochodzić z biomasy i być związane z nią prawdopodobnie na drodze elektrostatycznej, odwracalnie. W chwili, gdy w roztworze pojawiły się jony metalu ciężkiego - nastąpiło wyparcie kationów (innych metali lub protonów) z miejsc je wiążących przez jony metali ciężkich. Nastąpił proces **wymiany jonowej**. Stężenie równoważnikowe jonów, z którymi wymiana nastąpiła (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Fe^{3+}) stanowiło ok. 27 % usuniętego jonu metalu ciężkiego, w tym: 40 % meq Na^+ , 30 % meq Mg^{2+} , 20 % meq Ca^{2+} , 5 % meq K^+ , 2,5 % meq Zn^{2+} , 2,5 % meq Fe^{3+} . Analiza składu pierwiastkowego biomasy potwierdziła występowanie tych jonów w komórkach *Spirulina sp.* Za pozostałą część usuniętego jonu metalu ciężkiego odpowiedzialna była wymiana z jonami H^+ (świadczy o tym zmniejszenie pH).



Rys. 8.4.1

Jony metalu uwalniane do roztworu w procesie biosorpcji jonów Cd^{2+} (przy różnym stężeniu początkowym jonów metalu)

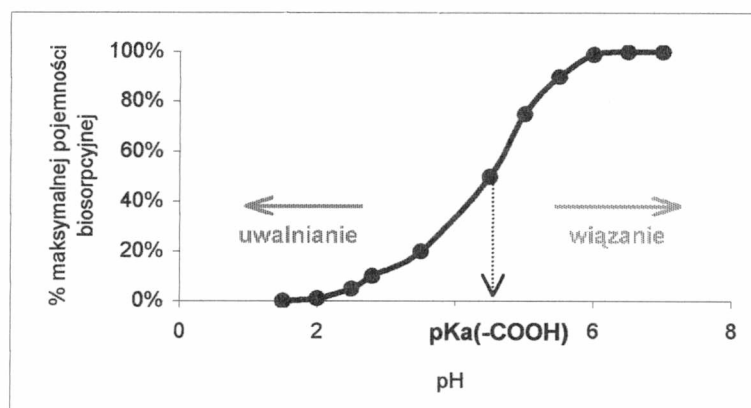
Czynniki wskazujące na możliwość znacznego udziału wymiany jonowej w procesie biosorpcji

Wiązanie jonów metalu na drodze wymiany jonowej znajduje potwierdzenie w budowie ściany komórkowej *Spirulina*, albowiem komórki alg otoczone są porowatą, trójwymiarową makromolekularną siecią - ścianą komórkową, której najważniejszymi składnikami są: peptydoglikan, którego polisacharydowa część zbudowana jest z polimeru β -1,4-N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylomuraminowego tworzącego trójwymiarową strukturę usieciowaną rozgałęzionymi polipeptydami (Rys. 3.3.2) [153]. Pozostałe składniki ściany komórkowej to m.in. kwasy teichuronowe i teichowe, polisacharydy oraz białka [249]. Większość z tych cząsteczek to polielektrolity, posiadające grupy funkcyjne, takie jak np. grupy karboksylowe, fosforylowe czy aminowe [60]. Obecność miejsc o charakterze zarówno anionowym jak i kationowym sprawia, że komórki alg mają charakter amfoteryczny i w zależności od pH grupy te są uprotonowane lub zdeprotonowane [276].

Miejsca wiążące jony metali

Jeżeli przyjąć, że dominującym mechanizmem biosorpcji jest proces wymiany jonowej, to na powierzchni komórek powinny znajdować się grupy funkcyjne zdolne do wiązania kationów, a ich pK_a będzie można wyznaczyć na podstawie miareczkowania potencjometrycznego. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia literaturowe, że istnieją pewne gatunki makroalg-biosorbentów, które wiążą jony metali na drodze wymiany jonowej [285]. Zidentyfikowano grupy funkcyjne, o charakterze kwasowo-zasadowym, obecne na powierzchni ich komórek. Wartości stałych kwasowych przedstawiono w Tabeli 8.4.1 [169].

Na Rys. 8.4.2 przedstawiono zależność pojemności biosorpcyjnej jonu metalu od pH na przykładzie wiązania przez słabo kwaśne grupy karboksylowe R-COOH (pK_a w zakresie 3,5-5,5), obecne na powierzchni ścian komórkowych alg jako składnik peptydoglikanu. Miareczkowanie konduktometryczne i potencjometryczne umożliwi wyznaczenie stężenia i rodzaju tych grup. Ich blokada chemiczna (estryfikacja i metylacja) powinna spowodować obniżenie zdolności biosorpcyjnych biomasy [121]. W literaturze badania takie przeprowadzono na przykładzie makroalg *Sargassum fluitans* [4, 150, 85, 86, 134], *Chlorella vulgaris* [136] oraz *Cyanidium caldarium* [136]. Wymiana jonowa pomiędzy jonami metalu i protonami a grupami o wyższym pK_a (np. R-NH₂) opisywana jest podobną zależnością jak w przypadku grup karboksylowych. Jednak wartość pH przy którym przebiega wiązanie metalu jest wyższa.



Rys. 8.4.2

Równowaga biosorpcji jako funkcja pH roztworu: wyższe pH sprzyja wiązaniu jonów metalu, niższe sprzyja desorpcji.

Grupy chemiczne biorące udział w procesie biosorpcji (Tabela 8.4.1), najczęściej mają charakter kwaśny. Gdy pH przekracza wartość pK_a , większość grup staje się dostępna dla kationów. Udział danej grupy w biosorpcji metalu poprzez biomasę, zależy od następujących czynników:

- liczba miejsc wiążących na powierzchni biosorbenta [mmol/g],
- dostępność tych miejsc,
- stan chemiczny miejsca (zjonizowanie) - stałe dysocjacji kwasowej oraz pH roztworu,
- powinowactwo pomiędzy kationem metalu a miejscem (K_M).

Dlatego pH ma fundamentalny wpływ na biosorpcję i jest kluczowym parametrem: specjacja metalu w roztworze jest zależna od pH. W przypadku gdy jony metalu znajdują się w roztworze jako wolne, uwodnione formy w niskich pH, wodorotlenki formują się w miarę jego wzrostu. Skrajne pH może ponadto doprowadzić do zniszczenia biosorbenta.

Tabela 8.4.1
Grupy funkcyjne znajdujące się na powierzchni komórek alg [102, 228, 244, 169]

Grupa funkcyjna	pK _a	Atom ligandowy	Obecność w wybranych biocząsteczkach
karboksylowa	1,7-4,7	O	kwasy uronowe, aminokwasy (w białkach i peptydoglikanie)
fosforanowa	6,1-6,8	O	fosfolipidy
sulfyhydrylowa	8,3-10,8	S	aminokwasy
aminowa	8,0-11,0	N	chitosan, aminokwasy
hydroksylowa	9,5-13,0	O	polisacharydy, kwasy uronowe, aminokwasy,
karbonylowa	9,5-13,0	O	wiązanie peptydowe
amidowa, II-rzędowa amina	13,0	N	chityna, peptydoglikan, wiązanie peptydowe

Grupy funkcyjne podlegają równowagom kwasowo-zasadowym [22]. Przykładowo dla jonów dwuwartościowych (8.4.1), stałą dysocjacji kwasowej grupy funkcyjnej opisano równaniem (8.4.2). Wiązanie jonów metalu do grup funkcyjnych opisano równaniem (8.4.3), a stałą tej reakcji równaniem (8.4.4).



$$K_{al} = \frac{[RH]}{[R^-][H^+]} \quad (8.4.2)$$



$$K_{al} = \frac{[RM^+]}{[R^-][M^{2+}]} \quad (8.4.4)$$

R - miejsce wiążące kationy na powierzchni komórki

[...] - równowagowe stężenia molowe

Przy założeniu, że istnieje jeden rodzaju miejsca wiążącego, stężenie grup funkcyjnych w biosorbencie (w jednostce masy) (od którego zależy pojemność biosorpcyjna) (Φ , mmol/g lub meq/g) (8.4.5):

$$\phi = [RH] + [RM^+] + [R^-] \quad (8.4.5)$$

[R] - stężenie całkowite grupy funkcyjnej

Wstawiając równanie (8.4.2) i (8.4.4) do (8.4.5), ilość metalu związanego z biomasa w stanie równowagi ($X_{add} = [RM^+]$, mmol/g) może być wyrażona równaniem (8.4.6), które opisuje zależność X_{add} (stężenie metalu w biomacie) od stężenia metalu w roztworze (opisane w postaci izotermi Langmuira) oraz zależności X od pH w postaci typowej krzywej sigmoidalnej (krzywa miareczkowania).

$$X_{add} = \frac{\phi K_{M1} [M^{2+}]^{1/n}}{1 + K_{H1} [H^+]^{1/n} + K_{M1} [M^{2+}]^{1/n}} \quad (8.4.6)$$

Jeżeli założymy istnienie kilku miejsc wiążących kationy, wówczas równania (8.4.2) i (8.4.4) powinny zostać napisane dla każdego miejsca wiążącego R_i , a całkowite stężenie grup wiążących kationy to suma (8.4.7).

$$\Phi = \sum_{i=1}^n \phi_i \quad (8.4.7)$$

gdzie Φ_i to stężenie poszczególnego miejsca wiążącego jony metalu R_i . Ilość związanego metalu z biomasa można zatem opisać równaniem (8.4.8).

$$X_{add} = \Phi \sum_{i=1}^n \frac{K_{Mi} [M^{2+}]^{1/n}}{1 + K_{Hi} [H^+]^{1/n} + K_{Mi} [M^{2+}]^{1/n}} \quad (8.4.8)$$

8.5 Kwasowo-zasadowa charakterystyka powierzchni *Spirulina* sp.

Ściana komórkowa mikroalg *Spirulina* jest zbudowana z peptydoglikanu, a zatem na jej powierzchni powinny znajdować się aktywne grupy karboksylowe, aminowe oraz fosforylowa [102]. Właściwości kwasowo-zasadowe wykazywane przez komórki mają miejsce ze względu na stopniową deprotonację grup funkcyjnych, wraz ze wzrostem pH. Zachodzące reakcje można przedstawić następującymi równaniami równowagowymi (8.5.1-6):



W równaniach tych R opisuje ścianę komórkową, K - stałą równowagi, natomiast nawiasy kwadratowe reprezentują równowagowe stężenia (mol/dm^3). Równania te dotyczą zarówno dysocjacji kwasowo-zasadowej (równania (8.5.1-3)) jak i stałych równowagi opisujących wiązanie kationów metalu M^{n+} do biomasy (równania (8.5.4-6)). Z wartości tych wynika różne powinowactwo danego metalu do biomasy.

Jeżeli biomasa ma charakter słabo kwaśnego wymiennicza kationowymiennego, można ją scharakteryzować w podobny sposób jak kwasy wieloprotonowe, z uwzględnieniem różnego stężenia komórkowego grup funkcyjnych. Na krzywych miareczkowania kwasów wieloprotonowych (Rys. 8.5.1) widoczne są kolejne skoki, gdy kolejne stałe dysocjacji znacznie różnią się między sobą [108]. Pierwszy odcinek krzywej miareczkowania odpowiada reakcji:

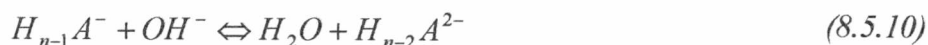


$$[H_3 O^+] = \sqrt{K_{a1} C_{HnA}} \quad (8.5.8)$$

W obszarze buforowym, między $x_{add}=0$ i $x_{add}=1$ (w obszarze skoku na krzywej miareczkowania) stosuje się następującą zależność:

$$[H_3 O^+] = K_{a1} \frac{[H_n A]}{[H_{n-1} A^-]} = K_{a1} \frac{C_{HnA} V_0 - C_B V}{C_B V} \quad (8.5.9)$$

W pierwszym punkcie równoważnikowym układ traktuje się nie jako roztwór zasady anionowej, ale jako roztwór amfolitu $H_{n-1} A^-$, mogącego zarówno przyłączać proton, jak i tracić następny proton. Następnie, poza pierwszym punktem równoważnikowym, dodanie zasady wywołuje reakcję:



wobec tego roztwór jest buforem, składającym się z kwasu $H_{n-1} A^-$ i zasady $H_{n-2} A^{2-}$, a więc:

$$[H_3 O^+] = K_{a2} \frac{[H_{n-1} A^-]}{[H_{n-2} A^{2-}]} \quad (8.5.11)$$

Występujące w tym równaniu stężenia $H_{n-1} A^-$ i $H_{n-2} A^{2-}$ można wyznaczyć na podstawie objętości i stężenia roztworu miareczkowanego oraz titranta. Dlatego stężenie postaci $H_{n-1} A^-$

$$[H_{n-1} A^-] = \frac{2C_{HnA} V_0 - C_B V}{V_0 + V} \quad (8.5.12)$$

natomiast $H_{n-2} A^{2-}$:

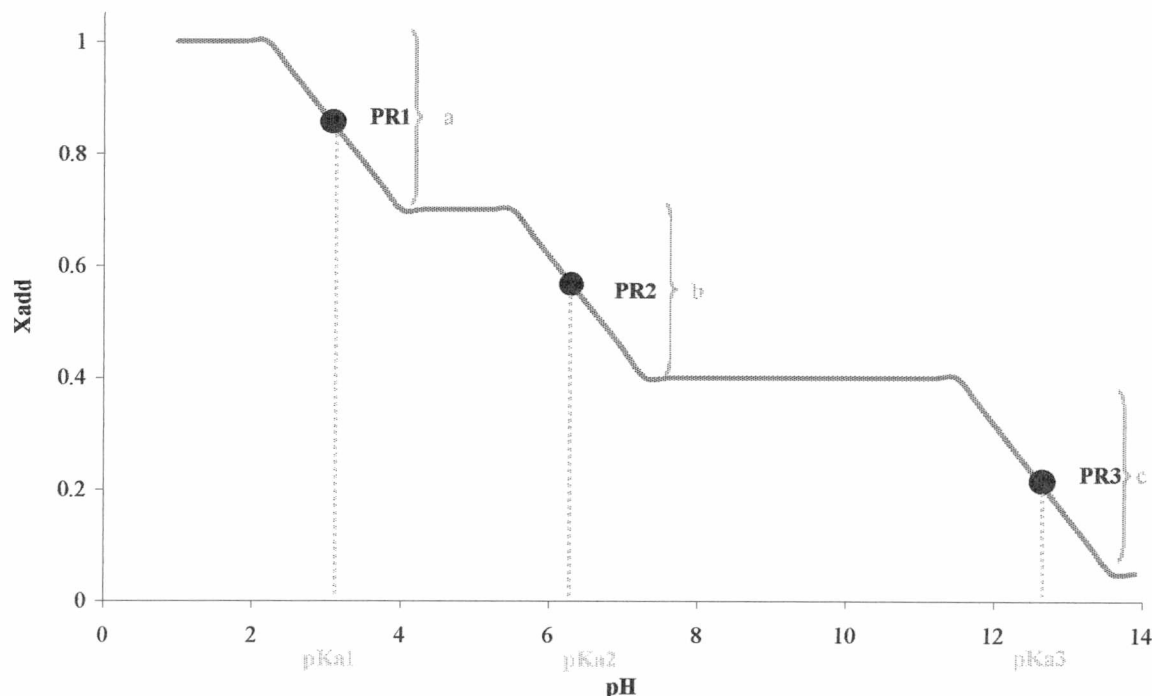
$$[H_{n-2} A^{2-}] = \frac{C_B V - C_{HnA} V_0}{V_0 + V} \quad (8.5.13)$$

Ostatni punkt równoważnikowy miareczkowania kwasu wieloprotonowego odpowiada roztworowi wieloprotonowej zasady A^{n-} :

$$K_{an} = \frac{[H_3 O^+] \left\{ \frac{C_B V - (n-1)C_{HnA} V_0}{V_0 + V} - [OH^-] \right\}}{\left\{ \frac{nC_{HnA} V_0 - C_B V}{V_0 + V} + [OH^-] \right\}} \quad (8.5.14)$$

gdzie:

- $C_{HnA} V_0$ - całkowita liczba moli początkowo obecnego kwasu wieloprotonowego
- $C_B V$ - liczba moli zasady dodanej od początku miareczkowania



Rys. 8.5.1

Krzywa miareczkowania słabego kwasu wieloprotonowego mocną zasadą

Przeprowadzono miareczkowanie potencjometryczne poszczególnych form morfologicznych mikroalg. Na Rys. 8.5.2 [237, 295, 296] przedstawiono krzywe miareczkowania, na podstawie których wyznaczono stałe dysocjacji kwasowej oraz stężenie komórkowe poszczególnych grup funkcyjnych. Wyniki zamieszczono w Tabeli 8.5.1. Rozważano trzy modele, biorąc pod uwagę istnienie 1, 2 oraz 3 grup funkcyjnych. Ostatni z tych modeli najlepiej opisuje zachodzące zjawiska. Parametry modelowe wyznaczono metodą regresji nieliniowej oraz na podstawie analizy przebiegu I- i II-pochodnej przy użyciu programu *Mathematica v. 3.0*.

Model 1-protonowy

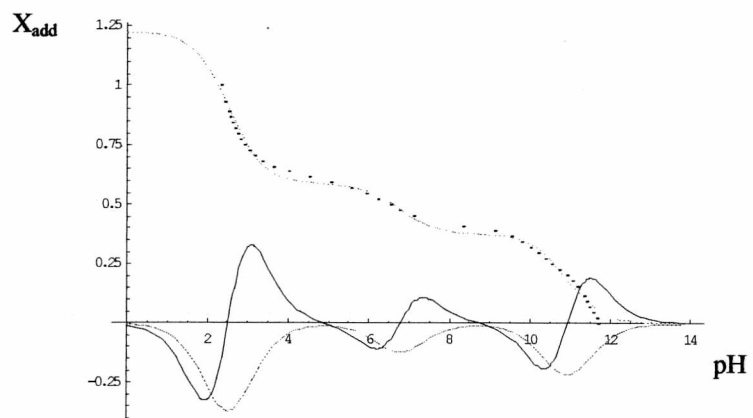
$$X_{add} = \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + K_{a1}} \quad (8.5.15)$$

Model 2-protonowy

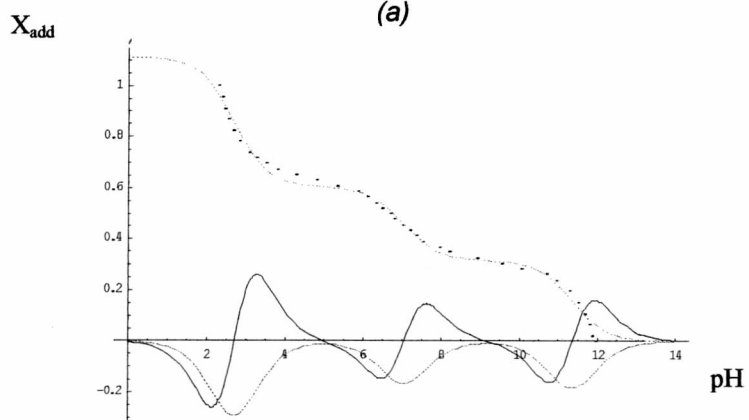
$$X_{add} = \frac{a}{1 + \frac{10^{-pH}}{K_{a1}} + 10^{pH} K_{a2}} + \frac{2b}{1 + 10^{pH} K_{a1} + 10^{2pH} K_{a1} K_{a2}} \quad (8.5.16)$$

Model 3-protonowy

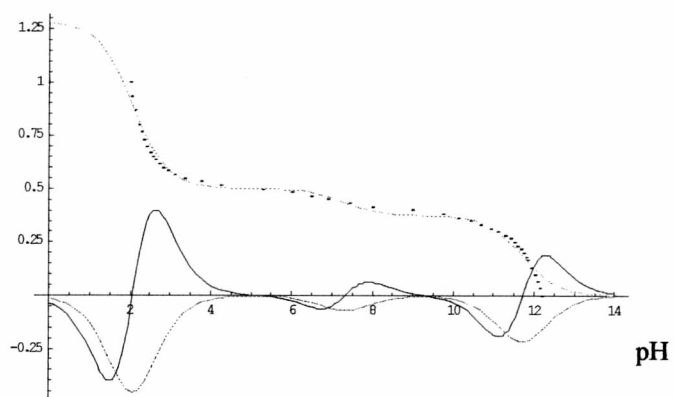
$$X_{add} = \frac{a}{1 + \frac{10^{-pH}}{K_{a2}} + \frac{10^{-2pH}}{K_{a1} K_{a2}} + 10^{pH} K_{a3}} + \frac{2b}{1 + \frac{10^{-pH}}{K_{a1}} + 10^{pH} K_{a2} + 10^{2pH} K_{a2} K_{a3}} + \frac{3c}{1 + 10^{pH} K_{a1} + 10^{2pH} K_{a1} K_{a2} + 10^{3pH} K_{a1} K_{a2} K_{a3}} \quad (8.5.17)$$



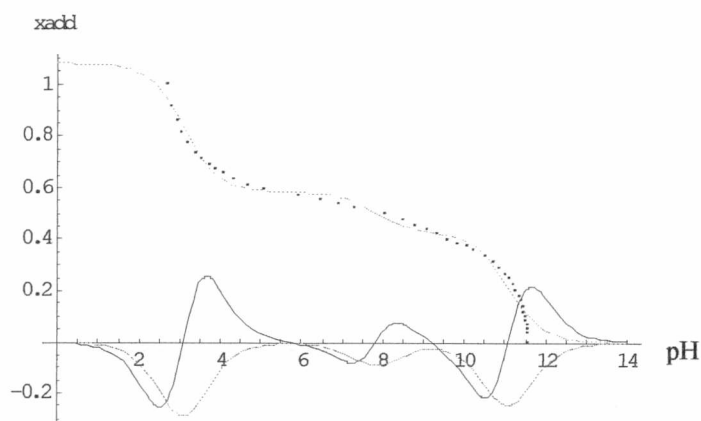
(a)



(b)



(c)



(d)

Rys. 8.5.2

Krzywa miareczkowania potencjometrycznego form R (a), M (b), A (c), H(d) Spirulina;

Tabela 8.5.1.

Stałe równowagi kwasowej obliczone na podstawie modelu zakładającego istnienie trzech grup funkcyjnych zdolnych do wymiany protonów.

Forma Spirulina sp.	pK ₁	Liczba moli danej grupy wiążącej metal [mmol/g]	pK ₂	Liczba moli danej grupy wiążącej metal [mmol/g]	pK ₃	Liczba moli danej grupy wiążącej metal [mmol/g]
R	2,51	6,8	6,78	5,3	10,77	7,4
H	3,09	5,5	7,81	3,8	11,08	4,7
M	2,71	4,8	7,05	4,6	11,34	5,7
A	2,06	7,7	7,32	5,4	11,70	8,8

Najwyższe stężenie komórkowe grup funkcyjnych znajduje się na powierzchni formy A. Forma ta posiada również najkorzystniejszy stosunek liczby grup karboksylowych, w stosunku do pozostałych o wyższej wartości pK_a. Grupy COO⁻ wykazują najwyższe powinowactwo w stosunku do jonów metalu ze względu na ich deprotonację w szerokim zakresie pH, a zatem dostępność dla jonów metali. Zdolność wiązania metalu silnie zależy od pH: np. w pH=7 w przypadku biosorpcji przez formę R dostępnych jest 7,45 meq/g grup funkcyjnych, a zatem 1 g s.m. komórek może związać maksymalnie: 130 mg Cr³⁺, 420 mg Cd²⁺, 240 mg Cu²⁺, natomiast w pH 8: 180 mg Cr³⁺, 570 mg Cd²⁺, 320 mg Cu²⁺ a w pH 11,5: 220 mg Cr³⁺, 710 mg Cd²⁺, 400 mg Cu²⁺. O ilości związanego jonu w danym pH decyduje stała wiązania metal-biomasa, jak to przedstawiono w równaniach (8.5.4-6). Wartość tej stałej zależy od jonu metalu, jego walencyjności oraz wartości pK_a grup funkcyjnych.

W zależności od pH różne grupy funkcyjne biorą udział w wiązaniu jonów metali ciężkich:

- w pH 2-5 - grupa karboksylowa
- w pH 5-9 - grupa karboksylowa i fosforylowa
- w pH 9-12 - grupa karboksylowa, fosforylowa i aminowa

Doświadczenia opisujące równowagę procesu biosorpcji (izotermy) (Rys. 8.2.4) przeprowadzono w pH 7. W warunkach tych grupy karboksylowe oraz część grup

fosforylowych jest zdeprotonowana, czyli dostępna dla jonów metalu. Obrazuje to wielkość $q_{\max}$, która niekiedy przyjmuje wartości większe niż stężenie wszystkich grup karboksylowych w komórce (Tabela 8.5.2).

W Tabeli 8.5.3 przedstawiono stopień związania jonów metalu w pH 7 w stosunku do sumy grup karboksylowych i fosforylowych (stężenie jonów metalu związanych przez jednostkę masy sorbenta/stężenie grup karboksylowych i fosforylowych w jednostce masy sorbenta), gdyż tylko te dwie grupy są w stanie zdeprotonowanym w pH=7. Największą pojemność wiązania jonów metalu stwierdzono dla jonów chromu (III) - największy ułamek grup funkcyjnych związanych z jonami metalu.

Tabela 8.5.2
Stężenie grup funkcyjnych (karboksylowych, fosforylowych i aminowych) a maksymalna pojemność biosorpcyjna ($q_{\max}$ - wyznaczone na podstawie izotermy)

forma	grupa karboksylowa [meq/g s.m.]	grupa karboksylowa +fosforylowa [meq/g s.m.]	grupa karboksylowa +fosforylowa +aminowa [meq/g s.m.]	$q_{\max}(\text{Cr})$ [meq/g s.m.]	$q_{\max}(\text{Cd})$ [meq/g s.m.]	$q_{\max}(\text{Cu})$ [meq/g s.m.]
R	6.8	12.1	19.5	10.7	1.77	6.17
H	5.5	9.3	14	2.50	0.482	1.32
M	4.8	9.4	15.1	2.22	0.775	1.05
A	7.7	13.1	21.9	7.03	2.83	4.02

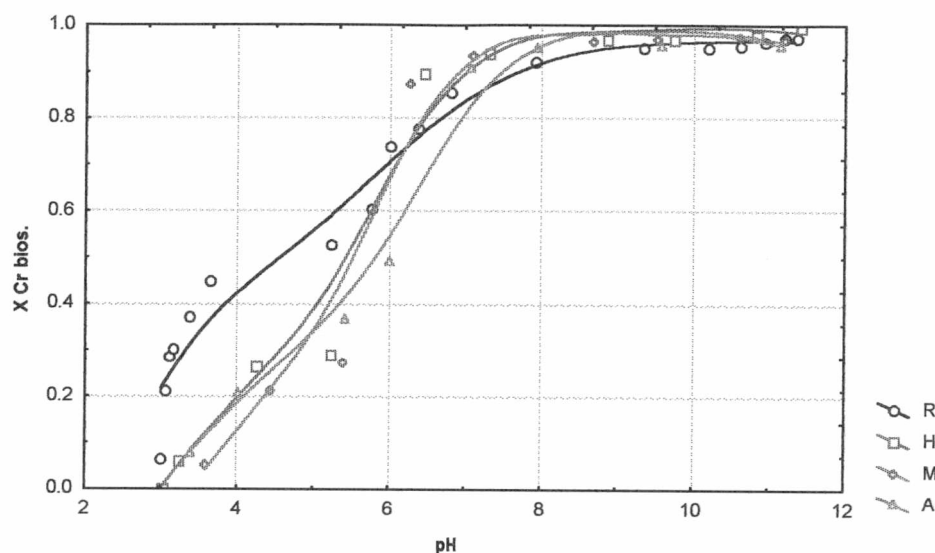
Tabela 8.5.3
Stopień związania grup funkcyjnych (karboksylowej i fosforylowej) z jonami metalu [%]

forma	Cr	Cd	Cu
R	88.4	14.6	51.0
H	43.0	5.2	14.2
M	23.6	8.2	11.2
A	53.7	21.6	30.7

8.6 Wyznaczenie stałych wiązania jonów metalu do poszczególnych grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni komórki.

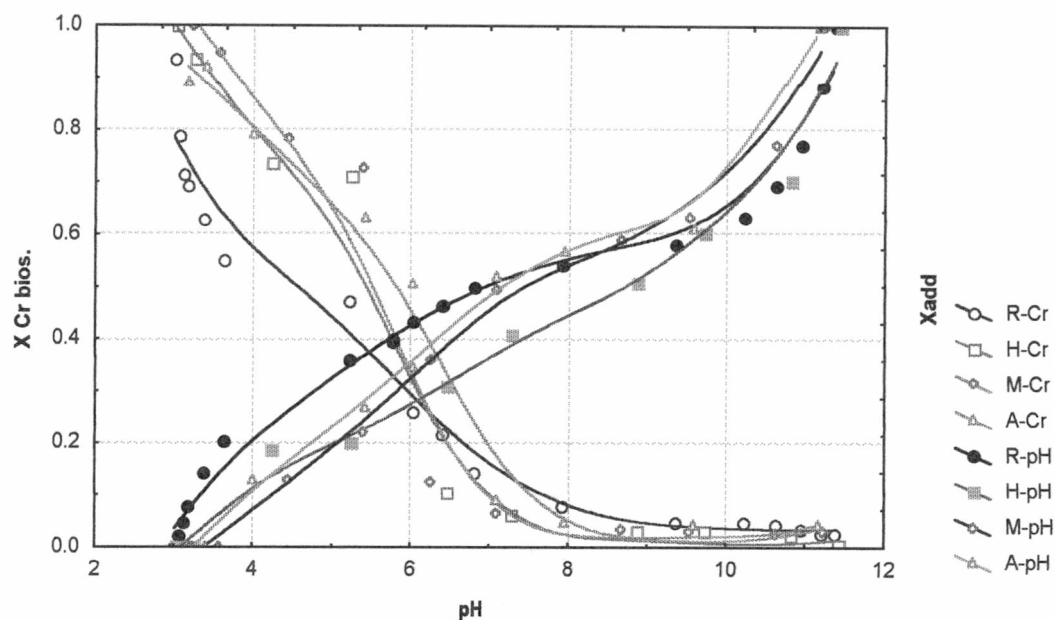
Wyniki doświadczeń mających na celu wyznaczenie stałych wiązania metalu do biomasy w zależności od pH przedstawiono na Rys. 8.6.1 i 8.6.2. W niskim pH, wszystkie grupy funkcyjne są w pełni uprotonowane, a zatem nie następuje w tych warunkach biosorpcja jonów metalu na drodze wymiany jonowej. W miarę wzrostu pH, powierzchnia ściany komórkowej stopniowo ulega deprotonacji, czego rezultatem jest wzrost zdolności biosorpcyjnych.

Miareczkowanie zawiesiny zawierającej jony metalu oraz mikroalgi umożliwiło wyznaczenie wartości stałych wiązania grup funkcyjnych do jonów metalu (jak przedstawiono w równaniach 8.5.4-8.5.6). Wyniki przedstawiono w Tabeli 8.6.1.



Rys. 8.6.1

Ułamek molowy usuniętych jonów Cr^{3+} przez poszczególne morfologiczne formy mikroalg ($X \text{ Cr bios.}$) w zależności od pH



Rys. 8.6.2

Wpływ ułamka molowego dodanego titranta (X_{add}) na pH oraz na stopień usunięcia jonów Cr^{3+} ($X \text{ Cr bios.}$)

W pH 3 udział biosorpcji jest znikomy. W miarę wzrostu pH, pojemność biosorpcyjna rośnie, osiągając wartość maksymalną w pH 7-8. Dalsze zwiększanie pH nie powoduje zwiększenia pojemności biosorpcyjnej. Sugeruje to, że grupy aminowe, których $\text{pK}_a > 8$ nie biorą aktywnego udziału w procesie biosorpcji. Być może przyczyną tego jest bardzo niskie stężenie jonów metalu w roztworze w $\text{pH} > 8$, które jest niższe niż stężenie kationów związanych w grupami funkcyjnymi - prawdopodobnie wówczas następuje przesunięcie kationów wcześniej związanych z grupami karboksylowymi i fosforylowymi na grupy aminowe.

Formy A i R posiadają ok. 20 % więcej grup funkcyjnych, które mogą wiązać się z jonami metali, natomiast ich pojemność biosorpcyjna jest kilkakrotnie wyższa. Wiąże się to z większym udziałem grup karboksylowych (o ok. 25 %) i fosforylowych (o ok. 35 %) w formach R i A w stosunku do M i H. Stałe powinowactwa do jonów metali są natomiast podobne (Rys. 8.6.1-2, Tabela 8.6.1). Stanowi to dodatkowy dowód o większej aktywności grup karboksylowych i fosforylowych (niż aminowych) w wiązaniu jonów metalu.

Tabela 8.6.1
Stałe wiązania (powinowactwa) metalu przez biomasę oraz stężenie grup wiążących

Forma <i>Spirulina</i> sp.	pK _{M1}	Liczba moli grupy w 1 g bakterii [mmol/g]	pK _{M2}	Liczba moli grupy w 1 g bakterii [mmol/g]	pK _{M3}	Liczba moli grupy w 1 g bakterii [mmol/g]
R	2,88	3,80	3,37	3,48	3,85	3,47
H	3,06	3,10	3,80	2,30	4,40	4,30
M	3,08	2,90	3,74	2,17	4,44	4,52
A	3,05	3,94	3,65	3,22	4,23	4,43

8.7 Desorpcja jonów metalu związanych z biomasą.

W każdym procesie usuwania jonów metali ciężkich następuje zatężenie metalu (skoncentrowanie) oraz przeprowadzenie go w formę mniej mobilną. Nie istnieje bowiem możliwość rozłożenia metalu, a jedynie zmiana fazy w której występuje. Po procesie biosorpcji otrzymywana jest biomasa, do której powierzchni związane są jony metalu. W takiej postaci stężenie jonów w biomasie wynosi nawet (200 mg/g s.m.). Metal związany z biomasą należałoby odzyskać i preferencyjnie wykorzystać w procesie produkcji jego związków. Istnieją różne możliwości odzysku jonów metalu, np. metodą destrukcyjną (spopielenie; koncentrat metalu w fazie stałej) lub niestrukcyjną (odmycie; uzyskanie koncentratu metalu w fazie ciekłej i regeneracja biomasy). Komórki *Spirulina* posiadają wysoką wartość opałową (14.4 kJ/g). Popioły ze spalania biomasy zawierają do 40 % metalu.

Ważnym zagadnieniem jest dobór techniki desorpcyjnej, która zależy od mechanizmu biosorpcji. Jeżeli mechanizmem jest głównie wymiana jonowa, siła jonowa roztworu oraz pH będą głównymi czynnikami od których proces zależy i dzięki którym może zostać odwrócony. Dobrymi desorbentami powinny być zatem kwasy oraz czynniki chelatujące - wiązanie jonów metalu do grup kwasowych powinno zostać odwrócone poprzez obniżenie pH, a zatem poprzez uprotonowanie grup funkcyjnych [169, 243-249].

Przetestowano efektywność trzech różnych eluentów: wody dejonizowanej, 0.1 mol/dm³ EDTA oraz 0.1 mol/dm³ HNO₃ (Tabela 8.7.1). Wydajność elucji zdefiniowano jako procent ekstrakcji jonów metali ciężkich znajdujących się na powierzchni komórek [45]. Stwierdzono, że woda dejonizowana nie jest efektywnym eluentem (1-3 % elucji). EDTA jest znacznie lepszym desorbentem (40-60 %), natomiast zastosowanie jako eluenta 0.1 mol/dm³

HNO_3 spowodowało odmycie prawie całego metalu z powierzchni komórki (90-98 %). Doświadczenie to wykazało, że biosorpcja jest procesem zachodzącym na powierzchni ściany komórek alg, jest w pełni odwracalna (poprzez zmianę pH) i nie zachodzi wprowadzanie jonów metalu do wnętrza komórki. Słabe zdolności elucyjne wody dejonizowanej, są korzystne, ponieważ świadczą o stabilności wiązania jonów metalu z biomasą.

Tabela 8.7.1
Desorpcja chromu, kadmu i miedzi przez różne desorbenty EDTA, kwas azotowy oraz wodę dejonizowaną.

eluent	Cr^{3+} zdesorbowany [%]	Cd^{2+} zdesorbowany [%]	Cu^{2+} zdesorbowany [%]
0.1 mol/dm ³ EDTA	60 %	41 %	53 %
0.1 mol/dm ³ HNO_3	98 %	90 %	95 %
woda dejonizowana	1 %	3%	2 %

Największa efektywność elucyjna kwasu azotowego w stosunku do jonów metalu z powierzchni komórek potwierdziła dodatkowo jonowymienny charakter procesu biosorpcji [52].

Ważnym zagadnieniem jest dobór nie tylko rodzaju eluenta, ale również jego stężenia, na przykład w przypadku kwasu azotowego, zastosowanie bardziej rozcieńczonego kwasu (Tabela 8.7.2) spowodowało odmycie znacznie mniejszej części metalu ze względu na zbyt niskie stężenie konkurujących z jonami metalu protonów. Wykorzystanie natomiast bardziej stężonego kwasu (Tabela 8.7.2) spowodowało destrukcję biomasy. Wielkości te można również przewidzieć teoretycznie na podstawie znajomości stałych K_a oraz K_M . Desorbent powinien nie tylko usuwać dużą część związanego z biomasą metalu, ale przede wszystkim nie powinien prowadzić do destrukcji biosorbenta, czy obniżenia jego pojemności biosorpcyjnej.

Tabela 8.7.2
Wpływ stężenia kwasu azotowego na stopień elucji oraz zmianę właściwości pojemności biosorpcyjnych biomasy

stężenie HNO_3 [mol/dm ³]	[%] elucji	obniżenie pojemności biosorpcyjnej [%]	uwagi
0,01	62	20 %	nie odmyto wszystkich jonów metalu duży stopień elucji, zachowanie właściwości biosorpcyjnych biomasy elucja wszystkich jonów, ale znaczna utrata właściwości biosorpcyjnych
0,10	98	4 %	
1,00	100	51%	

Przy analizie techniki desorpcyjnej warto zastanowić się nad wartościami współczynnika koncentracji. Przykładowo, przy biosorpcji jonów Cr^{3+} przez formę R, $C_0=170$ mg/kg, $C_{eq}=55$ mg/kg, $X=0.635$ g/dm³, $q=181.2$ mg/g, $V=0.25$ dm³, $V_{eluenta}=0.001$ dm³. W tym przypadku współczynnik koncentracji w biomacie wynosi 1066, natomiast w roztworze elucyjnym: 166 w stosunku do roztworu wyjściowego. Są to wartości korzystne dla procesów oczyszczania ścieków rozcieńczonych.

8.8 Chemiczna modyfikacja grup funkcyjnych na powierzchni komórki

W celu określenia udziału danej grupy funkcyjnej w procesie biosorpcji, przeprowadzono chemiczną ich modyfikację, a następnie przetestowano obniżenie zdolności kationowymiennych (biosorpcja oraz miareczkowanie), aby sprawdzić jaka część zdolności kationowymiennych biomasy została utracona na skutek modyfikacji chemicznych danej grupy funkcyjnej.

Wyniki badań nad chemicznie zmodyfikowaną powierzchnią komórek przedstawiono w Tabeli 8.8.1. W przypadku biosorpcji jonów chromu zaobserwowano, że proces ten jest hamowany gdy grupy karboksylowe i fosforylowe są zestryfikowane, wskazując na ważną rolę jaką odgrywają w procesie biosorpcji jonów metali ciężkich. Nieznaczne obniżenie zdolności biosorpcyjnych biomasy uzyskane dla grup aminowych które zmetylowano, wskazuje, że grupy te mają niewielki udział w biosorpcji. Doświadczenia te potwierdziły, że dominującym mechanizmem procesu biosorpcji jest wymiana jonowa, w której udział biorą głównie grupy karboksylowe i fosforylowe, a w znacznie mniejszym stopniu aminowe.

Tabela 8.8.1

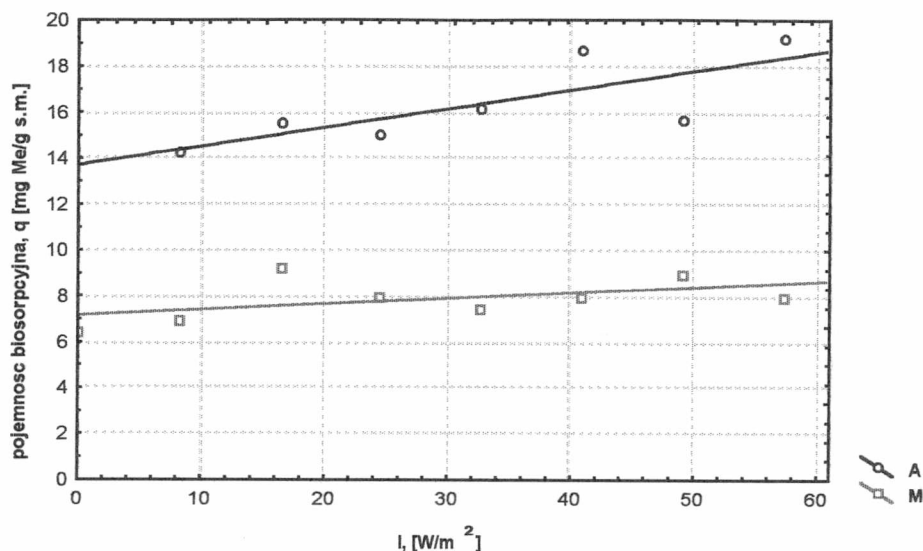
Wpływ modyfikacji chemicznych grup funkcyjnych na powierzchni biomasy na pojemność biosorpcyjną oraz kationowymienną (badania przeprowadzono dla morfologicznej formy R oraz Cr³⁺)

zablokowana grupa	pojemność biosorpcyjna w porównaniu do próby kontrolnej	zdolność wymiany protonów w porównaniu do próby kontrolnej
	[%]	[%]
karboksylowa i fosforylowa	60.97	62.2
aminowa	15.55	37.8
bez blokowania (próba kontrolna)	100	100

8.9 Wpływ parametrów hodowli na pojemność biosorpcyjną komórek

Kluczowym zagadnieniem przy hodowli biomasy do celów biosorpcyjnych jest nie tylko optymalizacja warunków namnażania w celu osiągnięcia największej produktywności biomasy, ale przede wszystkim uzyskanie najwyższej jakości biomasy, mierzonej pojemnością biosorpcyjną. W literaturze nie spotkano się z próbą określenia czy parametry hodowli: natężenie światła i stężenie glukozy będą miały wpływ na pojemność biosorpcyjną biomasy.

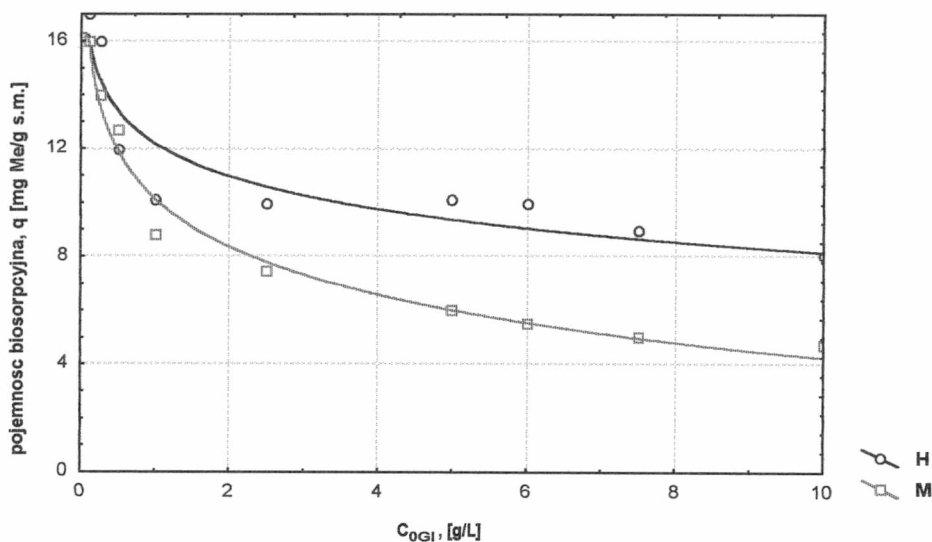
Określono wpływ natężenia światła na pojemność biosorpcyjną (Rys. 8.9.1). Stwierdzono, że wpływ I na q jest znacznie silniejszy w hodowli autotroficznej niż miksotroficznej (tu prawdopodobnie silniejszy jest wpływ obecności glukozy). Odnotowano, że pojemność biosorpcyjna komórek miksotroficznych jest ok. dwukrotnie niższa niż autotroficznych.



Rys. 8.9.1

Pojemność biosorpcyjna komórek w hodowli auto- i miksotroficznej w zależności od natężenia światła;
 $C_{Cr^{3+}} = 30,5\ mg/kg$

Pojemność biosorpcyjna (Rys. 8.9.2) maleje ze wzrostem początkowego stężenia glukozy zarówno dla komórek wyhodowanych na drodze miksotroficznej, jak i heterotroficznej. Konsekwencją wyższych stężeń glukozy w pożywce jest wyższe stężenie komórek, jednak komórek o niższej pojemności biosorpcyjnej jonów metali ciężkich. Pojemność biosorpcyjna komórek heterotroficznych jest wyższa niż miksotroficznych.



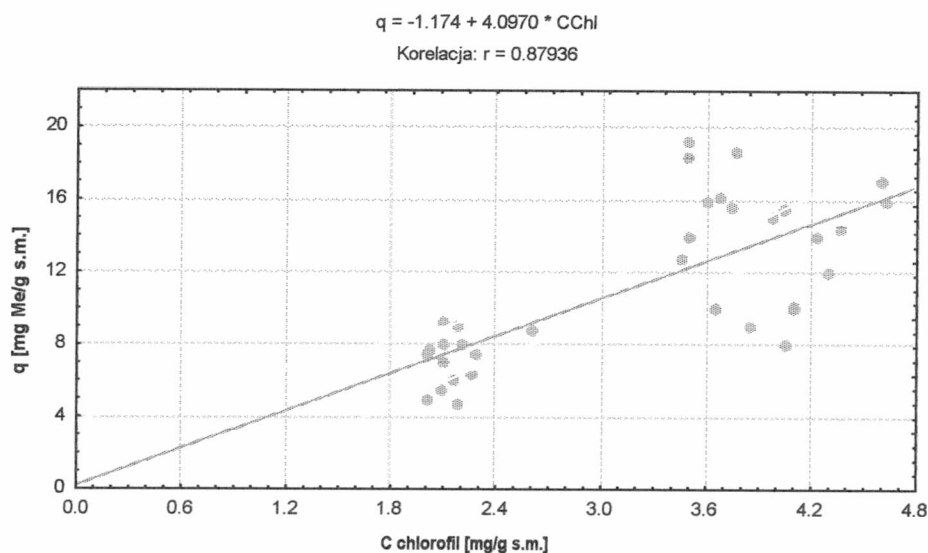
Rys. 8.9.2

Zdolności biosorpcyjne komórek w hodowli hetero- i miksotroficznej w zależności od stężenia początkowego glukozy; $C_{Cr^{3+}} = 30,5\ mg/kg$

Zaobserwowano, że komórki namnożone z wykorzystaniem pojedynczych metabolizmów (auto- i heterotrofii) charakteryzują się większą pojemnością biosorpcyjną niż komórki wyhodowane w metabolizmie mieszanym (miksotroficznym). Pojemność biosorpcyjna rośnie ze wzrostem natężenia światła zarówno dla hodowli autotroficznej, jak i

miksotroficznej, natomiast maleje ze wzrostem początkowego stężenia glukozy. Jest wyższa dla komórek autotroficznych niż miksotroficznych.

Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy stężeniem komórkowym chlorofilu a pojemnością biosorpcyjną (Rys. 8.9.3). Zarówno zawartość barwników fotosyntetycznych jak i skład ściany komórkowej (decydujący o zdolności wiązania jonów metali ciężkich) wynikają z metabolizmu oraz dostępności substratów, jednak trudno określić bezpośredni związek pomiędzy nimi.



Rys. 8.9.3

Korelacja pomiędzy stężeniem komórkowym chlorofilu oraz pojemnością biosorpcyjną

9. BIOAKUMULACJA

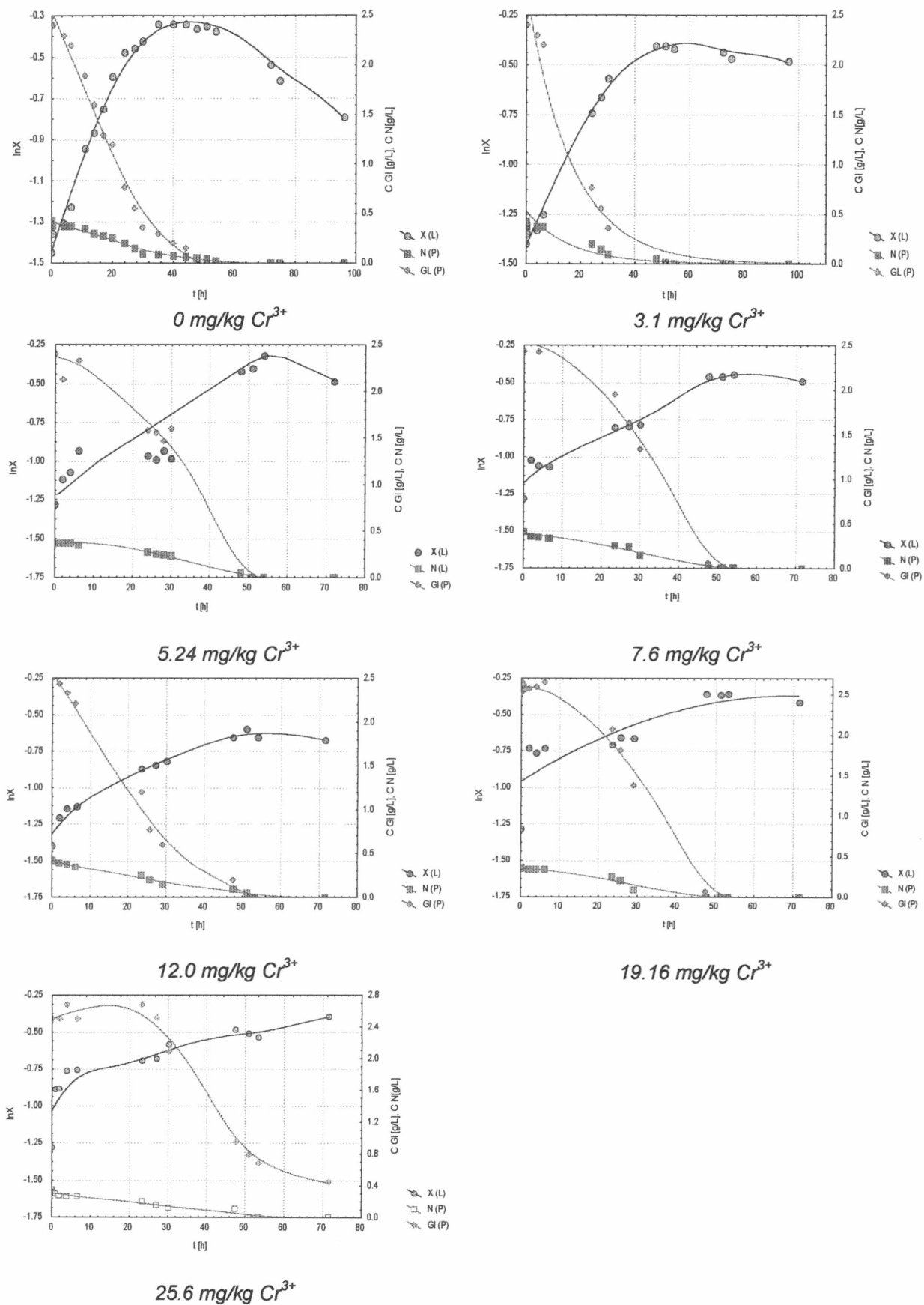
9.1 Wpływ obecności jonów metalu na kinetykę wzrostu

Toksyczny lub hamujący wzrost wpływ jonów chromu (III) powinien znaleźć odzwierciedlenie w parametrach kinetycznych (μ) oraz statycznych ($Y_{X/S}$) wzrostu. Badania nad wpływem jonów metalu na wzrost przeprowadzono w celu określenia wpływu ich obecności na te wielkości. Określono również usuwanie jonów Cr^{3+} w czasie oraz mechanizm tego procesu.

Porównano wzrost komórek *Spirulina* w obecności jonów Cr^{3+} względem próby kontrolnej nie zawierającej tych jonów w hodowli miksotroficznej ($I=32.7 \text{ W/m}^2$, $C_{GI}=2.5 \text{ g/dm}^3$) (Rys. 9.1.1). Zastosowano stężenie początkowe jonów Cr^{3+} w pożywce w zakresie 0-25.6 mg/kg. Dobrany zakres stężeń oparto na doniesieniach literaturowych, które podają, że zastosowanie wyższych stężeń jonów prowadzi do całkowitego zahamowania przyrostu biomasy.

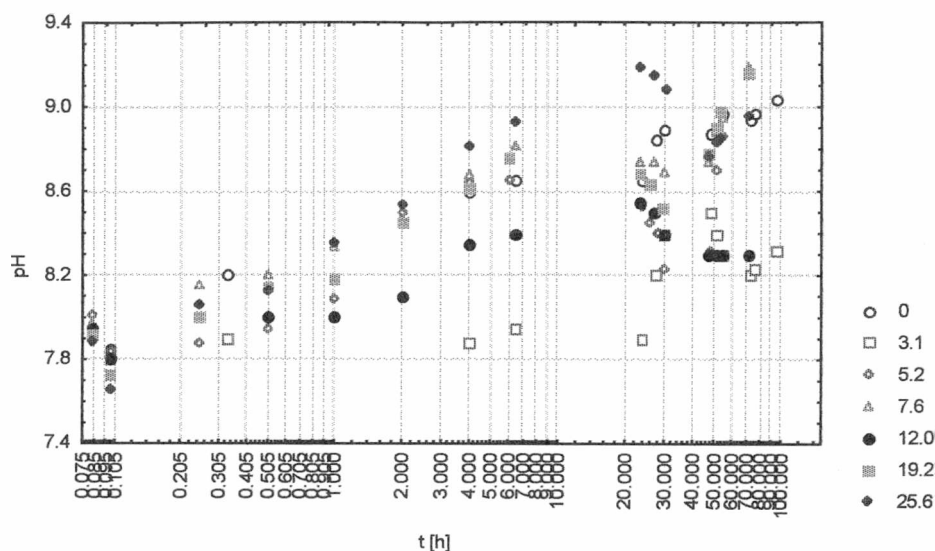
Stężenie końcowe namnożonej biomasy w każdym z badanych przypadków było podobne ($0.6\text{-}0.7 \text{ g/dm}^3$) (Rys. 9.1.1). Stwierdzono wpływ jonów chromu na przyrost biomasy oraz konsumpcję substratów (glukozy i azotu-azotanowego) (Rys. 9.1.1). Obecność tych jonów spowodowała spowolnienie wzrostu mikroorganizmów, oraz zmianę w metabolizmie glukozy, która w początkowej fazie nie była konsumowana w obecności wysokich stężeń jonów Cr^{3+} (19.2 oraz 25.6 mg/kg), przy jednoczesnej konsumpcji azotu i przyroście biomasy. Oznacza to wzrost autotroficzny - korzystanie ze światła jako źródła energii. We wzroście autotroficznym występuje korzystne dla procesu bioakumulacji zwiększenie pH (Rys. 9.1.2) jako efekt konsumpcji CO_2 z wodorowęglanu. Wzrost pH sprzyja deprotonacji miejsc wiążących jony na powierzchni komórki. Na wartość pH mają wpływ również inne czynniki: wypieranie protonów związanych z powierzchnią komórki przez jony chromu powoduje obniżenie pH, podobnie jak konsumpcja glukozy (wzrost heterotroficzny, produkcja CO_2).

Dopiero gdy stężenie Cr^{3+} w pożywce zostanie wystarczająco obniżone, następuje miksotroficzny wzrost komórek (konsumpcja glukozy). Dostosowanie rodzaju prowadzonego metabolizmu (autotroficzny lub heterotroficzny) do stężenia jonów metali ciężkich jest przykładem mechanizmów adaptacyjnych mikroalg. W pierwszym etapie komórki unieszkodliwiają jony metalu. Dopiero gdy metal zostanie bezpiecznie zdeponowany w strukturach komórkowych, rozpoczyna się konsumpcja glukozy i przyrost biomasy.



Rys. 9.1.1

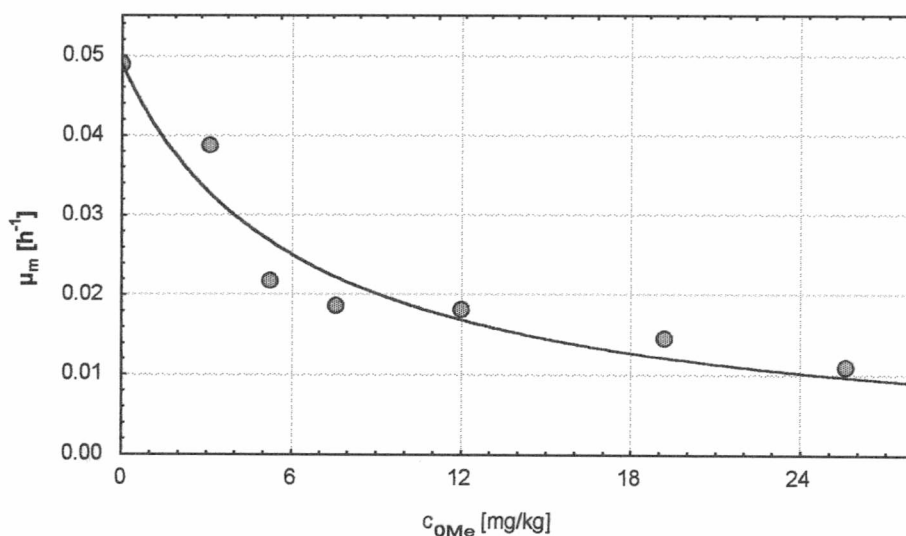
Stężenie biomasy oraz substratów podczas hodowli komórek w obecności jonów Cr^{3+}



Rys. 9.1.2

Zmiany pH podczas hodowli *Spirulina* w obecności jonów Cr^{3+}

We wszystkich doświadczeniach obecność jonów Cr^{3+} spowodowała zmniejszenie specyficznej szybkości wzrostu (Rys. 9.1.3). Zaobserwowano znaczne różnice pomiędzy szybkością wzrostu hodowli zawierających chrom i próby kontrolnej (bez jonów chromu). Nawet przy niewielkim stężeniu jonów Cr^{3+} (3.1 mg/kg) nastąpiło zmniejszenie szybkości wzrostu o 20 %, natomiast przy stężeniu 25.6 mg/kg o 76 %. Dlatego w procesie bioakumulacji należy się spodziewać znacznego obniżenia szybkości namnażania biomasy. Podobną prawidłowość zaobserwował Leborans [147] dla kadmu i *Olithodiscus luteus* oraz Aoyama [7] dla chromu i kadmu [7] dla szczepów *Chlorella*.



Rys. 9.1.3

Wpływ obecności jonów Cr^{3+} na specyficzną szybkość wzrostu (μ)

Jony metali ciężkich (w przeciwieństwie do zanieczyszczeń organicznych), nie są rozkładane. Ich całkowite stężenie w układzie nie ulega zmianie podczas trwania procesu.

Zmienia się jedynie forma w jakiej występują: ulegają związaniu w biomacie. Kwestią do tej pory nie rozwiązana pozostaje czy jon jest bardziej toksyczny dla komórki gdy znajduje się w roztworze, na powierzchni komórki czy w jej wnętrzu. W pracy przyjęto określenie wpływu sumy stężeń wszystkich form w jakiej jony metalu występują (czyli stężenie początkowe tych jonów, C_{0Me}) na parametry kinetyczne i statyczne wzrostu.

Zależność $\mu_m=f(C_{Me})$ opisano równaniem (9.1.1). Parametry modelowe wyznaczono metodą regresji nieliniowej (*Mathematica 3.0*). Wielkość K_i określa stężenie jonów przy którym specyficzna szybkość wzrostu zostaje obniżona o 50 % (w przypadku jonów chromu wynosi 6.33 mg/kg). W badanym zakresie stężeń nie stwierdzono całkowitego zahamowania wzrostu.

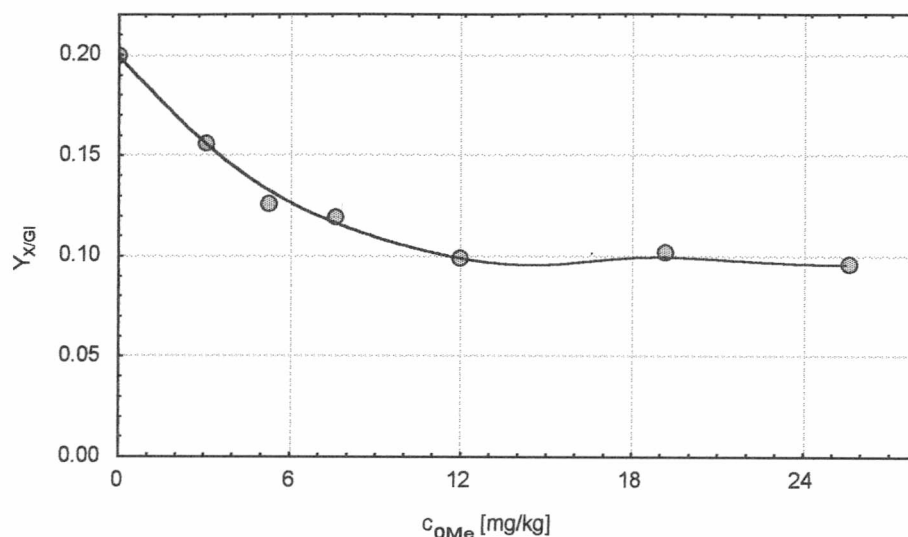
$$\mu_m(C_{Cr}) = \mu_m(I, C_{Gl}) \cdot \left(1 - \frac{C_{Me}}{K_i + C_{Me}}\right) \quad (9.1.1)$$

$$\mu_m(C_{Cr}) = \mu_m(I, C_{Gl}) \cdot \left(1 - \frac{C_{Me}}{6.33 + C_{Me}}\right) \quad (9.1.2)$$

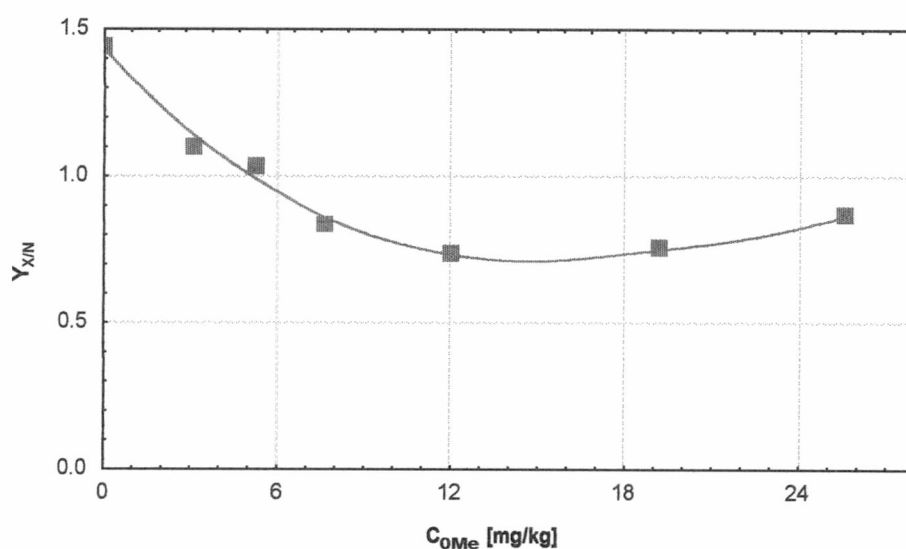
W literaturze nie znaleziono doniesień dotyczących bioakumulacji jonów Cr^{3+} przez *Spirulina sp.*, ale spotkano się z pracą nad usuwaniem i toksycznością jonów Cd^{2+} [220]. Autor przeprowadził badania nad wpływem jonów Cd^{2+} na wzrost dla stężeń 4-8-16-32 mg/kg w pożywce Zarrouk i zaobserwował, że przy stężeniu 32 mg/kg następuje całkowite zahamowanie wzrostu. Przy niższym stężeniu nastąpiło zmniejszenie szybkości wzrostu.

9.2 Wpływ obecności jonów metalu na statykę wzrostu

Zaobserwowano zmniejszenie wartości współczynników wydajności biomasy względem substratów (glukozy i azotanów) wraz ze wzrostem początkowego stężenia jonów Cr^{3+} (Rys. 9.2.1). Niski współczynnik $Y_{X/S}$ świadczy o syntezie niewielkiej ilości biomasy z danej ilości substratu. Dlatego w obecności jonów metali glukoza jest wykorzystywana na cele energetyczne, co jest związane z akumulacją jonów metalu oraz z procesem denitryfikacji ($Y_{X/N}$ również maleje). Wzmoczona denitryfikacja w procesie oczyszczania ścieków może być zjawiskiem korzystnym w przypadku dużego stężenia azotu, będzie jednak niepożądana, gdy środowisko będzie ubogie w azot. Wówczas jednak zmniejszenie początkowego stężenia glukozy spowoduje obniżenie wartości współczynnika $Y_{X/N}$, powodując zmniejszenie udziału denitryfikacji.



(a)

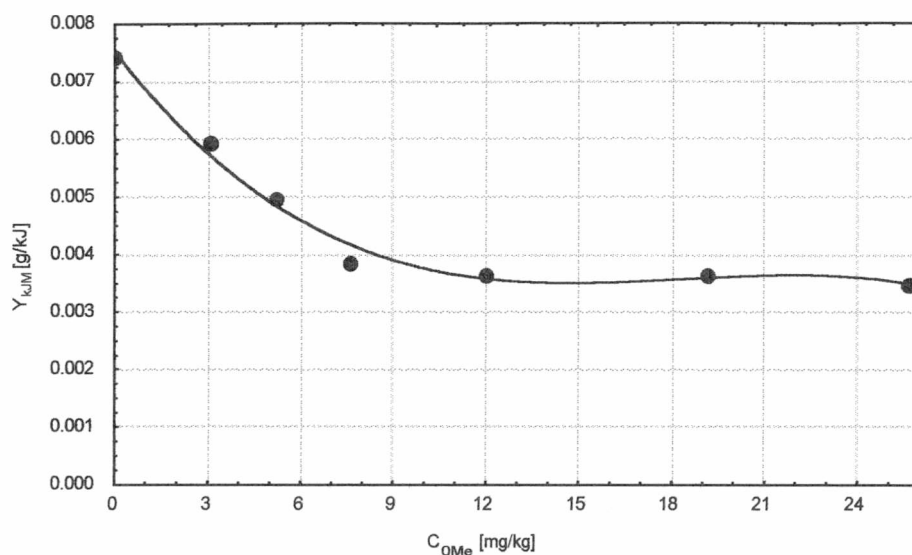


(b)

Rys. 9.2.1

Wpływ stężenia jonów Cr^{3+} na współczynniki wydajności biomasy względem glukozy ($Y_{X/Gl}$) (a) oraz azotu ($Y_{X/N}$) (b)

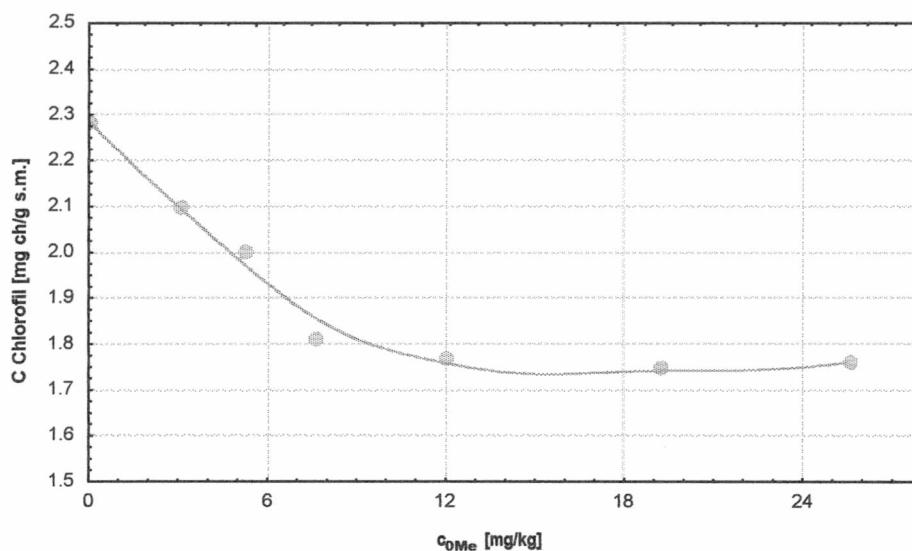
Analiza nakładów energetycznych i porównanie ich z hodowlą kontrolną (bez metalu) pozwoliło na oszacowanie metabolicznych kosztów wprowadzania jonów metalu do wnętrza komórki oraz detoksyfikacji wewnątrz (Rys. 9.2.2). Im wyższe stężenie początkowe jonów Cr^{3+} tym niższa wydajność bioenergetyczna. Pozostaje to w zgodzie z teorią, że bioakumulacja jest procesem konsumującym energię, w którym jony metalu są transportowane do wnętrza komórki na drodze transportu aktywnego. Prawdopodobnie, na wprowadzanie jonów metalu do wnętrza komórki zostaje przeznaczane od 33 % (5.2 mg/kg) do 53 % (25.6 mg/kg) energii.



Rys. 9.2.2

Wydajność bioenergetyczna hodowli komórek *Spirulina* w obecności jonów Cr^{3+}

Zaobserwowano, że obecność jonów metali ciężkich powoduje obniżenie komórkowego stężenia barwników fotosyntetycznych (Rys. 9.2.3), prawdopodobnie na skutek dezorganizacji chloroplastów spowodowanej wewnątrzkomórkową obecnością jonów metali ciężkich. Podobnie tłumaczy ten proces Leborans [147], który zauważył, że obecność kadmu i chromu spowodowała zmniejszenie zawartości barwników fotosyntetycznych u *O. luteus* o 13 %.



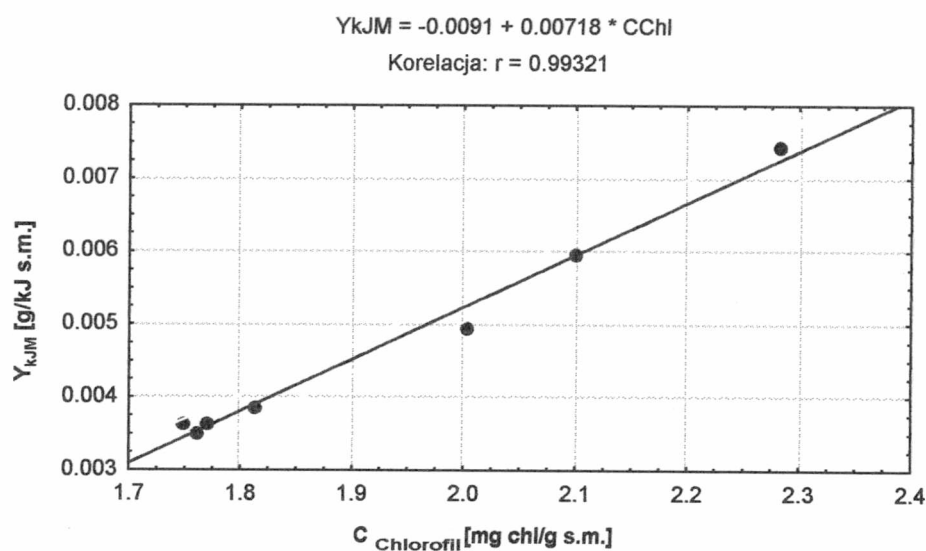
Rys. 9.2.3

Zawartość barwników fotosyntetycznych w zależności od początkowego stężenia jonów chromu

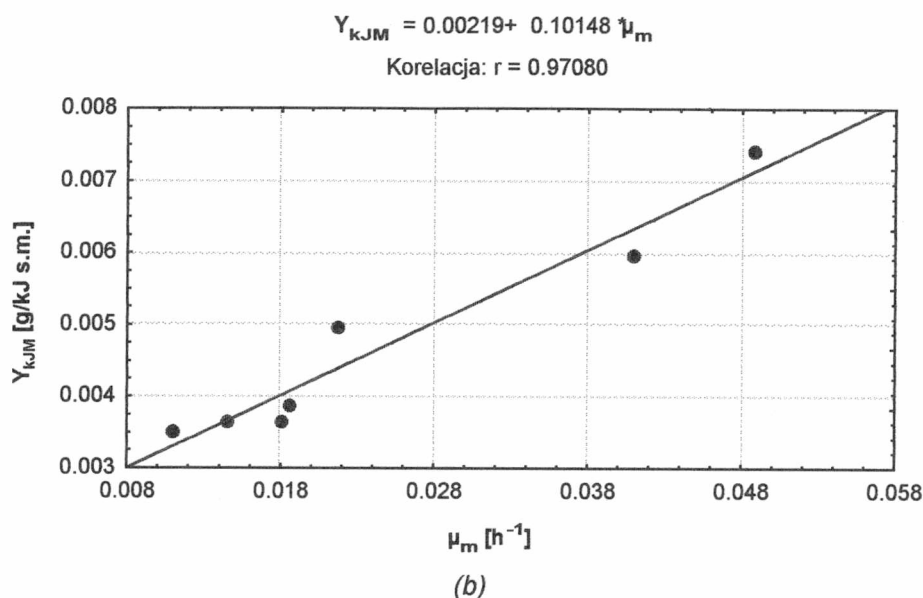
Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy stężeniem chlorofilu a wydajnością bioenergetyczną (Rys. 9.2.4 a). Można przypuszczać, że obecność jonów metalu wpływa na udział autotroficzny w hodowli mikstotroficznej, a nie na heterotroficzny. Prawdopodobnie, obecność jonów chromu powodując wyraźne obniżenie zawartości barwników

fotosyntetycznych, hamuje samą fotosyntezę, a w mniejszym stopniu tlenowy rozkład glukozy, mimo że pierwszym metabolizmem uruchamianym w obecności jonów jest autotrofia. Konsekwencją wewnątrzkomórkowej obecności jonów metali jest, że komórki raczej korzystają z energii zmagazynowanej w związkach chemicznych niż z energii światła słonecznego. Wobec stresu metabolicznego spowodowanego obecnością jonów metali, glukoza jest prawdopodobnie łatwiej dostępnym źródłem energii niż światło.

Innym wytłumaczeniem zmniejszenia specyficznej szybkości wzrostu oraz wydajności syntezy biomasy może być nie efekt toksyczny jonów chromu, ale konieczność przekazania części substratu na cele energetyczne związane z wprowadzaniem jonów metalu do wnętrza komórki. Świadczy o tym obserwowana liniowa korelacja pomiędzy μ_m a Y_{kJM} (Rys. 9.2.4b). Zmniejszenie μ_m w obecności jonów metalu może być zatem konsekwencją zwiększenia zapotrzebowania komórek na energię. Hipotezy te można potwierdzić jedynie doświadczalnie poprzez hodowlę w obecności znakowanej radioaktywnie glukozy.



(a)



Rys. 9.2.4

Korelacja pomiędzy zawartością chlorofilu (C chlorofil) (a) oraz specyficzną szybkością wzrostu (μ_m) (b) a wydajnością bioenergetyczną (Y_{kJM})

9.3 Mechanizm procesu bioakumulacji

Proces bioakumulacji jest kombinacją co najmniej dwóch procesów: sorpcji na biomacie, która zależy od stanu biomasy (powierzchnia „żyjąca” może posiadać inną charakterystykę niż „nieżyjąca”), od stężenia jonów metalu oraz aktywnego etapu bioakumulacji, który jest związany z wprowadzaniem jonów metalu do wnętrza komórki oraz z namnażaniem biomasy. W tym przypadku ważne jest określenie w jakim stopniu stężenie jonów metalu hamuje wzrost komórek, czyli produkcję nowej powierzchni sorpcyjnej, wprowadzanie jonów do wnętrza komórki przy jednoczesnym usuwaniu ich z powierzchni - zwalnianiu jej i udostępnianiu dla nowych jonów.

Przyjęto hipotezę, że na proces bioakumulacji składają się 2 etapy: 1 - pasywny (biosorpcja), 2 - aktywny (akumulacja właściwa). W celu udowodnienia tej hipotezy przeprowadzono doświadczenie zmierzające do wyjaśnienia mechanizmu bioakumulacji, w tym: udziału etapu pasywnego i aktywnego. Doświadczenie umożliwiające rozróżnienie jonów metalu znajdujących się na powierzchni komórki i w jej wnętrzu, przeprowadzono dla stężenia początkowego jonów 25.6 mg/kg, podczas którego monitorowano ilość metalu związanego w sposób odwracalny z biomasą (odmywalne 0.1 mol/dm³ HNO₃), ilość metalu związanego na trwałe z biomasą (metal znajdujący się wewnątrz komórek, tzn. metal nie odmywalny 0.1 mol/dm³ HNO₃, a który oznaczono po strawieniu biomasy stężonym HNO₃) oraz stężenia jonów metalu w roztworze (Rys. 9.3.1). Na podstawie tego doświadczenia stwierdzono, że ilość metalu związana z biomasą w sposób odwracalny (na drodze

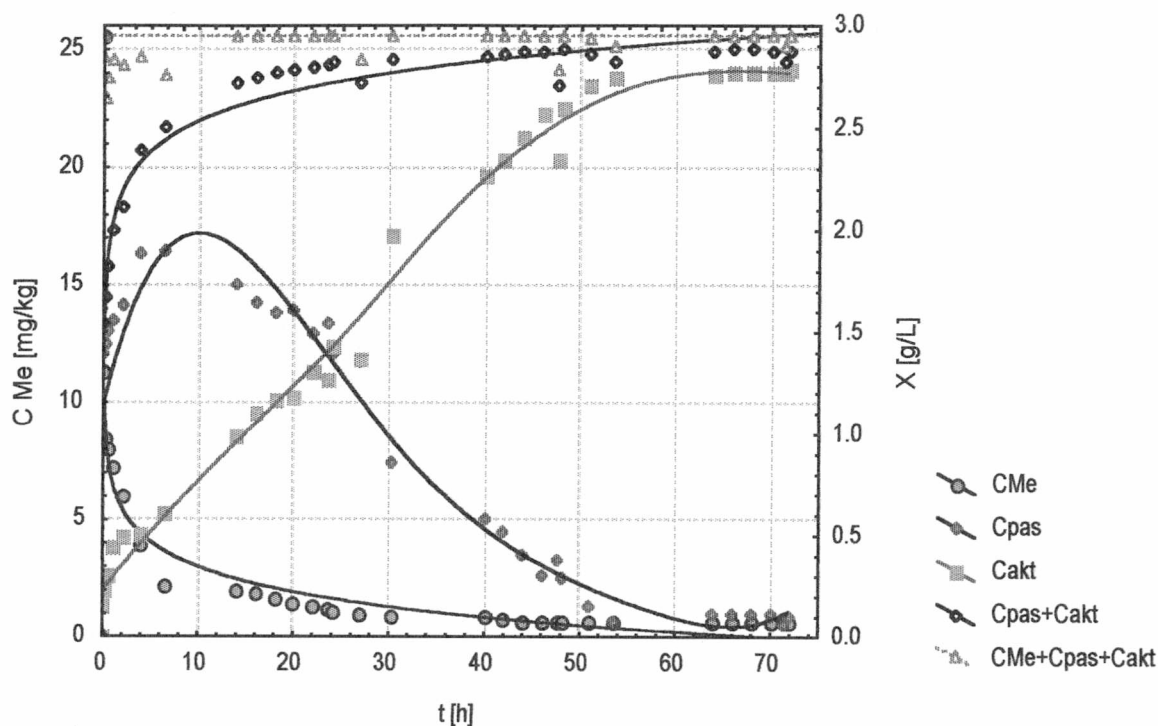
biosorpcyjnej) rośnie w ciągu pierwszych 7 h procesu, następnie maleje, niemal do poziomu zerowego w 55 godzinie. Komórki wprowadzają jony metalu do ich wnętrza, z jednoczesnym uwolnieniem miejsc wiążących jony metalu na jej powierzchni. Ilość metalu związana wewnątrz komórek rośnie podczas pierwszych 55 godzin procesu, podczas gdy stężenie w roztworze pozostaje stałe od 30 h. Proces zatem zostaje zakończony po 55 godzinach. Wówczas metal związany przez biomasę znajduje się głównie w jej wnętrzu, a powierzchniowe stężenie jonów jest bardzo niskie.

Mimo, że wiązanie jonów do powierzchni komórek jest podobnie jak biosorpcja, procesem szybkim, wiązanie jonów na drodze pasywnej trwa dłużej - ok. 7 h ze względu na namnażanie biomasy. Zewnętrzna pojemność wiązania jonów zostaje ustalona w ciągu kilkunastu minut (Rys. 9.3.2).

Doświadczenie nad mechanizmem potwierdziło wcześniejszą hipotezę, że proces bioakumulacji składa się z dwóch etapów:

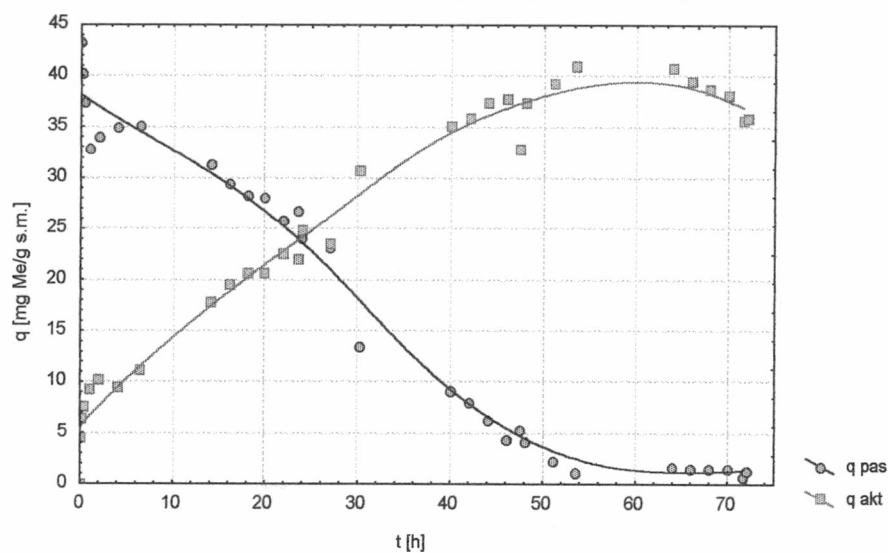
1. **pasywnego** (biosorpcja) - proces szybki, trwający kilka godzin, podczas którego następuje wiązanie jonów do powierzchni ściany komórkowej mikroalg
2. **aktywnego** (akumulacja właściwa) - etap trwający kilkadziesiąt godzin (tu: ok. 55); w etapie tym następuje transport jonów metalu do wnętrza komórki z jednoczesnym uwolnieniem miejsc wiążących na jej powierzchni i wiązaniem do nich kolejnych jonów metalu; równocześnie następuje namnażanie komórek (i namnożenie powierzchni biosorpcyjnej) oraz transport jonów do wnętrza, a pod koniec procesu, całkowite usunięcie jonów metalu z ich powierzchni.

Rozważając czas prowadzenia procesu bioakumulacji należy kierować się nie tylko stężeniem jonów metalu w roztworze, ale również stężeniem jonów metalu na powierzchni komórek (pojemność pasywna). Po 24 godzinach procesu stężenie jonów w roztworze stabilizuje się, ale proces bioakumulacji nie zostaje ukończony. Jony metalu wprowadzane są do wnętrza komórki. Po zakończeniu tego procesu pojemność pasywna jest niska i biomasa może zostać bezpośrednio wykorzystana jako biosorbent.



Rys. 9.3.1

Lokalizacja jonów metalu w procesie bioakumulacji; C_{Me} - stężenie metalu w roztworze, C_{pas} - stężenie metalu związanego na drodze biosorpcji pasywnej, C_{akt} - na drodze aktywnej, $C_{pas+Cakt}$ - całkowite stężenie metalu związanego z biomasą, $C_{Me+C_{pas}+C_{akt}}$ - suma stężenia jonów metalu w roztworze oraz związanego z biomasą



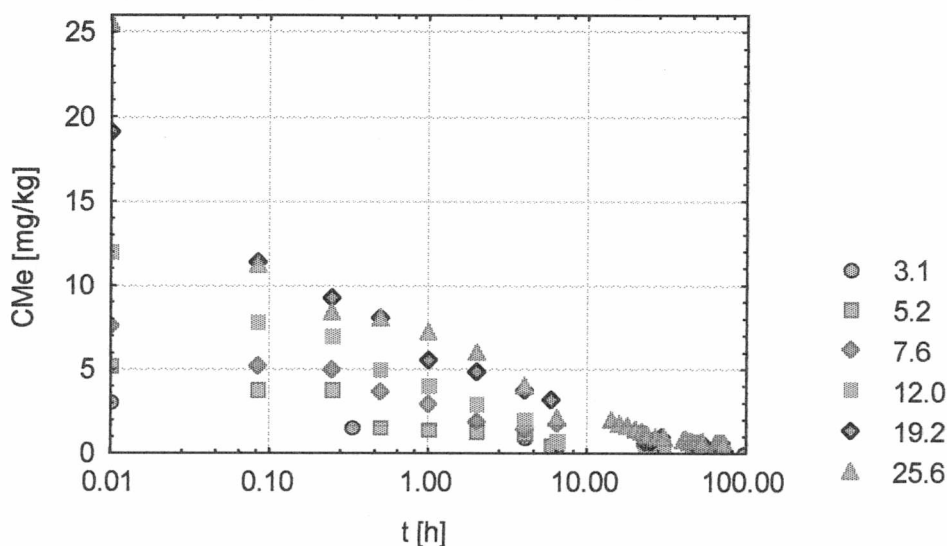
Rys. 9.3.2

Pojemność wiązania jonów w etapie pasywnym (q_{pas}) i aktywnym (q_{akt})

9.4 Kinetyka usuwania jonów metali ciężkich

Prace nad kinetyką usuwania jonów metali ciężkich pozwoliły na wyznaczenie parametrów potrzebnych do prawidłowego zaprojektowania jednostki usuwającej jony ze ścieków oraz dostarczyły informacji dotyczących mechanizmu procesu.

Na Rys. 9.4.1 przedstawiono zmiany stężenia jonów metalu w roztworze w czasie. Podczas procesu bioakumulacji następuje namnażanie biomasy. Stężenie końcowe (C_f) jonów metalu w procesie bioakumulacji jest niższe niż stężenie równowagowe w procesie biosorpcji (C_{eq}). Stężenie równowagowe metalu w roztworze w procesie bioakumulacji (C_f) zostaje osiągnięte po ok. 30 h. Największa część metalu zostaje usunięta w ciągu pierwszych 7 h w etapie pasywnym, który zachodzi z większą szybkością niż etap aktywny.



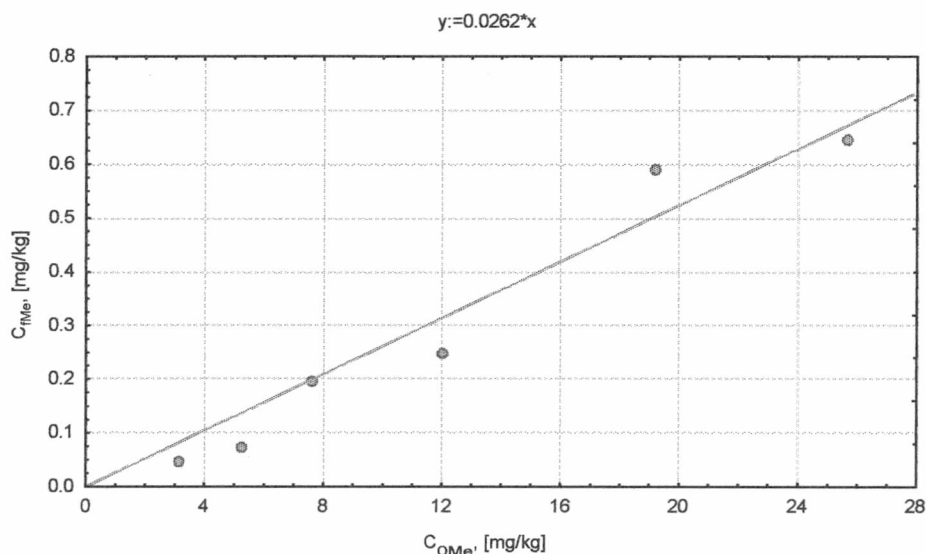
Rys. 9.4.1

Zależność stężenia jonów metalu w roztworze (C_{Me}) w funkcji czasu

Literatura podaje, że akumulacja jonów metali ciężkich zależy od zewnętrznego stężenia jonów metalu do momentu gdy zwiększone jego stężenie prowadzi do efektu toksycznego, a co za tym idzie: do zmniejszonej akumulacji. W zadanym zakresie stężeń jonów Cr^{3+} nie stwierdzono jednak takiej prawidłowości. W literaturze sprowadza się proces bioakumulacji (podobnie jak biosorpcji) do równowagowego procesu I-rzędowego. Większość autorów nie dyskutuje kinetycznie różnych etapów procesu. Bioakumulacja zostaje zakończona przy zadanych wartościach parametrów procesowych po upływie ok. 30 h (Rys. 9.4.1). Jony metalu są związane z biomasą trwale (co najmniej przez 80 h). Zarówno czas ekspozycji jak i stężenie jonów mają wpływ na proces bioakumulacji. W przypadku bioakumulacji jonów Cr^{3+} przez *Spirulina sp.* zaobserwowano jednak dwa kinetycznie różne etapy.

Dyskusja zależności stężenia równowagowego jonów metalu w roztworze od stężenia początkowego tych jonów (Rys. 9.4.2) (wobec dopuszczalnego przez polskie przepisy prawne limitu stężeń jonów Cr^{3+} na poziomie 0.5 mg/kg), pozwoliła na określenie przy jakim stężeniu początkowym jonów chromu i zadanych warunkach procesowych w roztworze (przy danym stężeniu komórek) dopuszczalne stężenie zostanie osiągnięte. Wartość tę określono na

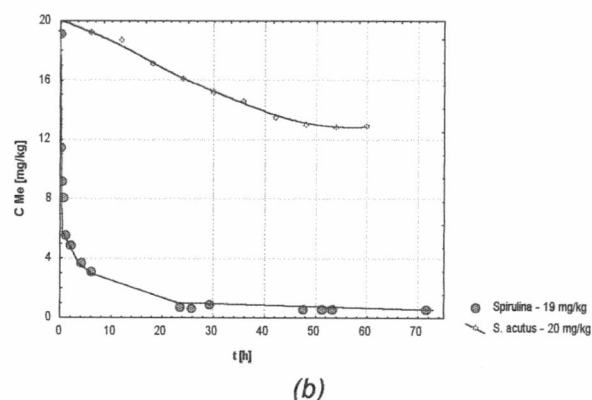
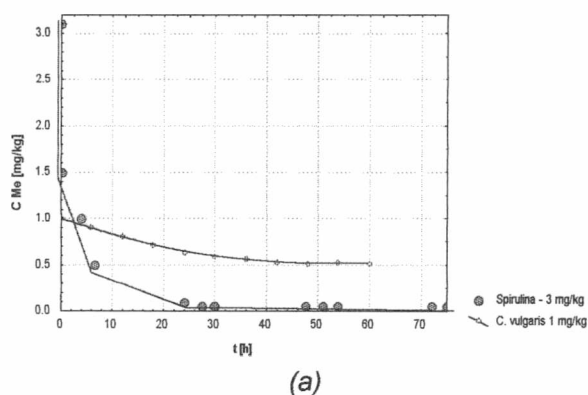
poziomie 18 mg/kg. W przypadku wyższego stężenia początkowego konieczne będzie zastosowanie wstępnego podczyszczenia metodą biosorpcji, zmieszanie ze ściekami o niższym poziomie tego zanieczyszczenia, zwiększenie stężenia biomasy lub substratów (co nie jest zalecane).



Rys. 9.4.2

Zależność stężenia równowagowego jonów metalu w roztworze (C_{Me}) od stężenia początkowego jonów ($C_{Me,0}$) przy danym stężeniu biomasy

Na Rys. 9.4.3 przedstawiono porównanie kinetyki usuwania jonów Cr^{3+} przez inne mikroalgi: *C. vulgaris* (Rys. 9.4.3 a) [7] oraz *S. acutus* (Rys. 9.4.3 b) [94]. Szybkość i pojemność bioakumulacyjna *Spirulina sp.* jest korzystniejsza niż u tych mikroalg, co uzasadnia wykorzystanie szczepu *Spirulina sp.* w procesie bioakumulacji.



Rys. 9.4.43

Porównanie kinetyki usuwania jonów Cr^{3+} oraz *Spirulina* i przez inne mikroalgi (*C. vulgaris* [328] (a) i *S. acutus* [94] (b))

9.5 Model procesu bioakumulacji

Zaproponowano mechanizm procesu bioakumulacji w postaci dwóch następujących, równowagowych reakcji, opisujących w pierwszym etapie wiązanie jonów metalu do

powierzchni biomasy (etap pasywny, C_{pas}), a następnie pobieranie do wnętrza komórki (etap aktywny C_{akt}), zgodnie z równaniem:



k - stała szybkości reakcji, $[h^{-1}]$

C - stężenie, $[mg/kg]$

gdzie postać „pas” jest produktem pierwszej z reakcji następnych i jednocześnie substratem dla drugiej, natomiast forma „akt” jest produktem drugiej reakcji. Przedstawiono równanie bilansu masy (9.5.2) oraz równania opisujące szybkość reakcji ubywania C_{Me} oraz powstawania C_{pas} i C_{akt} (9.5.3-9.5.5). Przyjęto, że szybkość procesu zależy od stężenia każdej formy jonów ($C_{Me}(t)$, $C_{akt}(t)$, $C_{pas}(t)$) oraz od stężenia biomasy ($X(t)$).

$$C_{akt}(t) + C_{Me}(t) + C_{pas}(t) = C_{Me,0} \quad (9.5.2)$$

$$\frac{dC_{Me}}{dt} = -k_1 X(t) C_{Me}(t) + k_{-1} C_{pas}(t) \quad (9.5.3)$$

$$\frac{dC_{pas}}{dt} = k_1 X(t) C_{Me}(t) - k_{-1} C_{pas}(t) - k_2 X(t) C_{pas}(t) + k_{-2} C_{akt}(t) \quad (9.5.4)$$

$$\frac{dC_{akt}}{dt} = k_2 X(t) C_{pas}(t) - k_{-2} X(t) C_{akt}(t) \quad (9.5.5)$$

W równaniach kinetycznych reprezentujących profile stężeniowe odpowiednio C_{Me} , C_{pas} , C_{akt} , $C_{Me,0}$ to stężenie początkowe jonów metalu w roztworze, natomiast $C_{Me,i}$, $C_{pas,i}$, $C_{akt,i}$ to odpowiednio stężenia metalu w roztworze, w postaci związanej na powierzchni komórki oraz w jej wnętrzu w czasie t_i .

Założono, warunki brzegowe $\{w t=0 C_{Me}=C_{Me,0}, C_{pas}=0 \text{ mg/kg}, C_{akt}=0 \text{ mg/kg}, X=0.28 \text{ g/dm}^3\}$, uwzględniające fakt, że na początku reakcji jony metalu obecne są tylko w roztworze. Powyższe równania można było rozwiązać tylko w sposób numeryczny (Rys. 9.5.1). Ponieważ rozwiązanie numeryczne nie pozwala na symulację procesu przy innym stężeniu jonów metalu, zdecydowano się wprowadzić pewne uproszczenia. Założono, stężenie biomasy nie zmienia się w czasie. Wówczas równanie to można było rozwiązać w sposób analityczny. Po zróżniczkowaniu wprowadzono zależność $X(t)$ i wyznaczono stałe szybkości reakcji.

Wyznaczenie stałych szybkości oraz weryfikacja teorii była możliwa dzięki rozróżnieniu jonów metalu związanych na powierzchni komórki od jonów znajdujących się w ich wnętrzu. Posługując się danymi doświadczalnymi stężeń jonów w roztworze, na

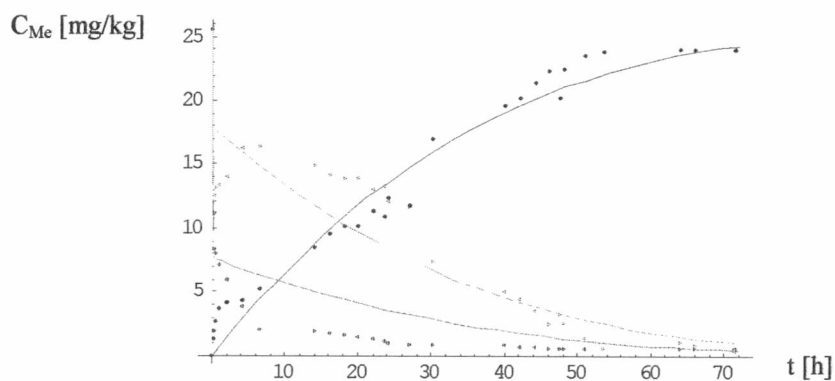
powierzchni komórki oraz w jej wnętrzu w czasie wyznaczono stałe szybkości reakcji k_1 , k_2 , k_{-1} , k_{-2} metodą regresji nieliniowej (*Mathematica 3.0*):

$$\begin{aligned}k_1 &= 9.36 & [h^{-1}] \\k_{-1} &= 3.67 & [h^{-1}] \\k_2 &= 0.0501 & [h^{-1}] \\k_{-2} &= 0.0196 & [h^{-1}]\end{aligned}\tag{9.5.6}$$

Wartości stałych szybkości I etapu bioakumulacji, czyli procesu pasywnego, są podobnego rzędu do wyznaczonych w doświadczeniach modelowych nad procesem biosorpcji, gdzie przy stężeniu początkowym jonów $Cr^{3+} = 26$ mg/kg $k_1/k_{-1} = 2.5$, natomiast w etapie pasywnym bioakumulacji $k_1/k_{-1} = 1.6$. Różnica w wartości stałej wynika z innego środowiska procesu. W przypadku biosorpcji sól chromową rozpuszczono w wodzie dejonizowanej, natomiast w bioakumulacji - w pożywce hodowlanej Zarrouk. Dodatkowo, mogą istnieć pewne różnice w wiązaniu jonów przez powierzchnię „żyjącą” i „nieżyjącą”.

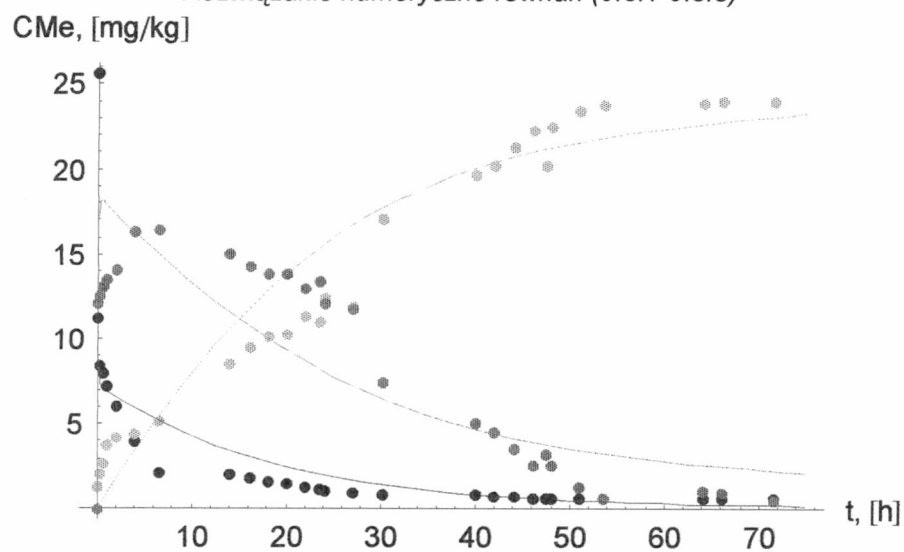
Punkty doświadczalne opisano równaniami modelowymi (Rys. 9.5.2). Zgodność modelu opisującego stężenie jonów metalu w roztworze (C_{Me}), stężenie związane w etapie pasywnym (C_{pas}) oraz aktywnym (C_{akt}) zweryfikowano na wartościach doświadczalnych dla $C_{Me,0} = 19.0$ mg/kg (Rys. 9.5.3) oraz na wartościach C_{Me} dla $C_{Me,0}$ 12 7.6, 5.2 oraz 3.1 mg/kg (Rys. 9.5.4).

Zaproponowany model, oparty na teorii reakcji równowagowych następczych uwzględniający zmianę stężenia biomasy w czasie opisuje zadowalająco stężenia wszystkich form metalu: C_{Me} , C_{pas} i C_{akt} w funkcji czasu. Odchylenia od modelu wynikają z biologicznej natury procesu. Założono bowiem, że etap aktywny jest opisywany równaniem jednej reakcji, podczas gdy istnieje prawdopodobieństwo równoległego zachodzenia kilku reakcji. Dodatkowo, o ile proces pasywny przeprowadzają wszystkie komórki, etap aktywny prowadzą tylko „żyjące”.



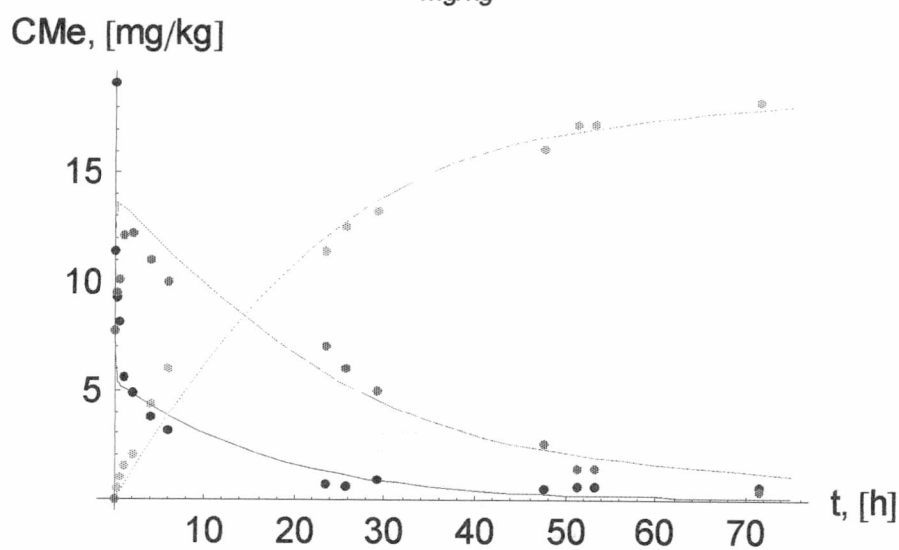
Rys. 9.5.1

Rozwiązanie numeryczne równań (9.5.1-9.5.5)



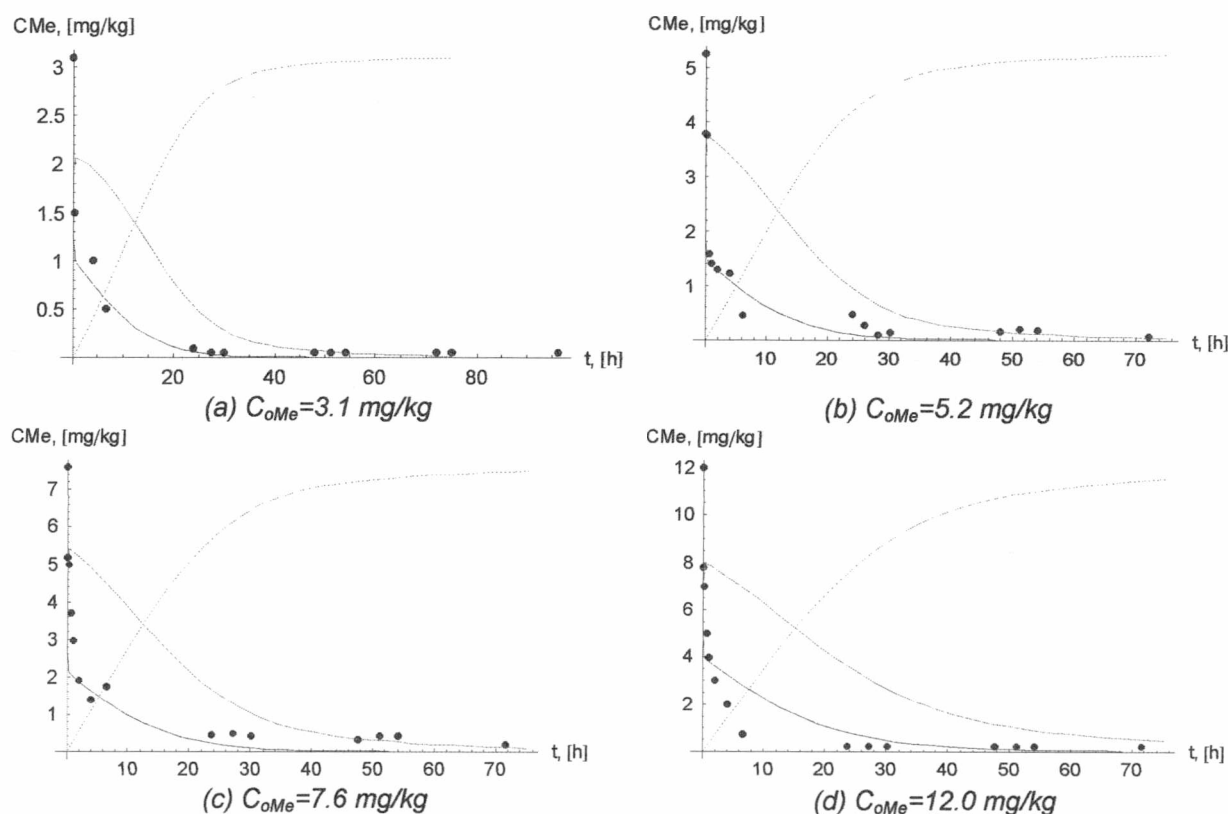
Rys. 9.5.2

Stężenie jonów metalu w roztworze (C_{Me}), związane przez powierzchnię (C_{pas}) oraz wewnątrz (C_{akt}) komórki - wyniki doświadczalne oraz opis modelowy; doświadczenie przeprowadzono przy $C_{Me,0}=25.6$ mg/kg



Rys. 9.5.3

Weryfikacja modelu - bioakumulacja jonów chromu przy $C_{Me,0}=19$ mg/kg - dane doświadczalne oraz modelowe

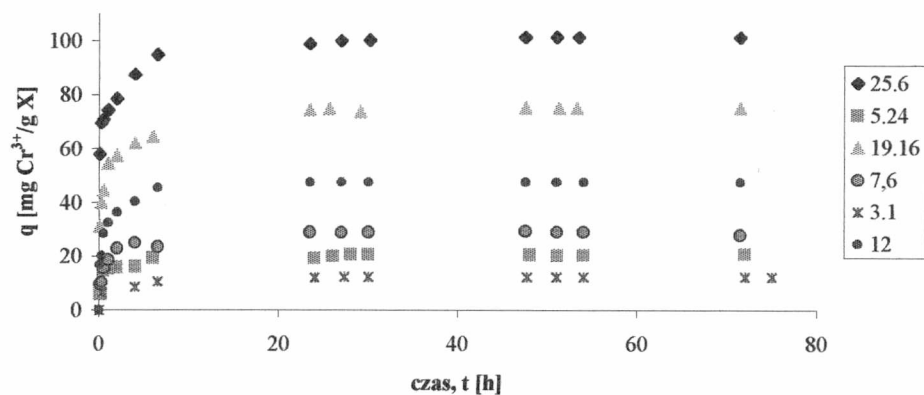


Rys. 9.5.4

Stężenie jonów metalu usuniętego na drodze bioakumulacji przy różnym $C_{Me,0}$ - dane doświadczalne i modelowe

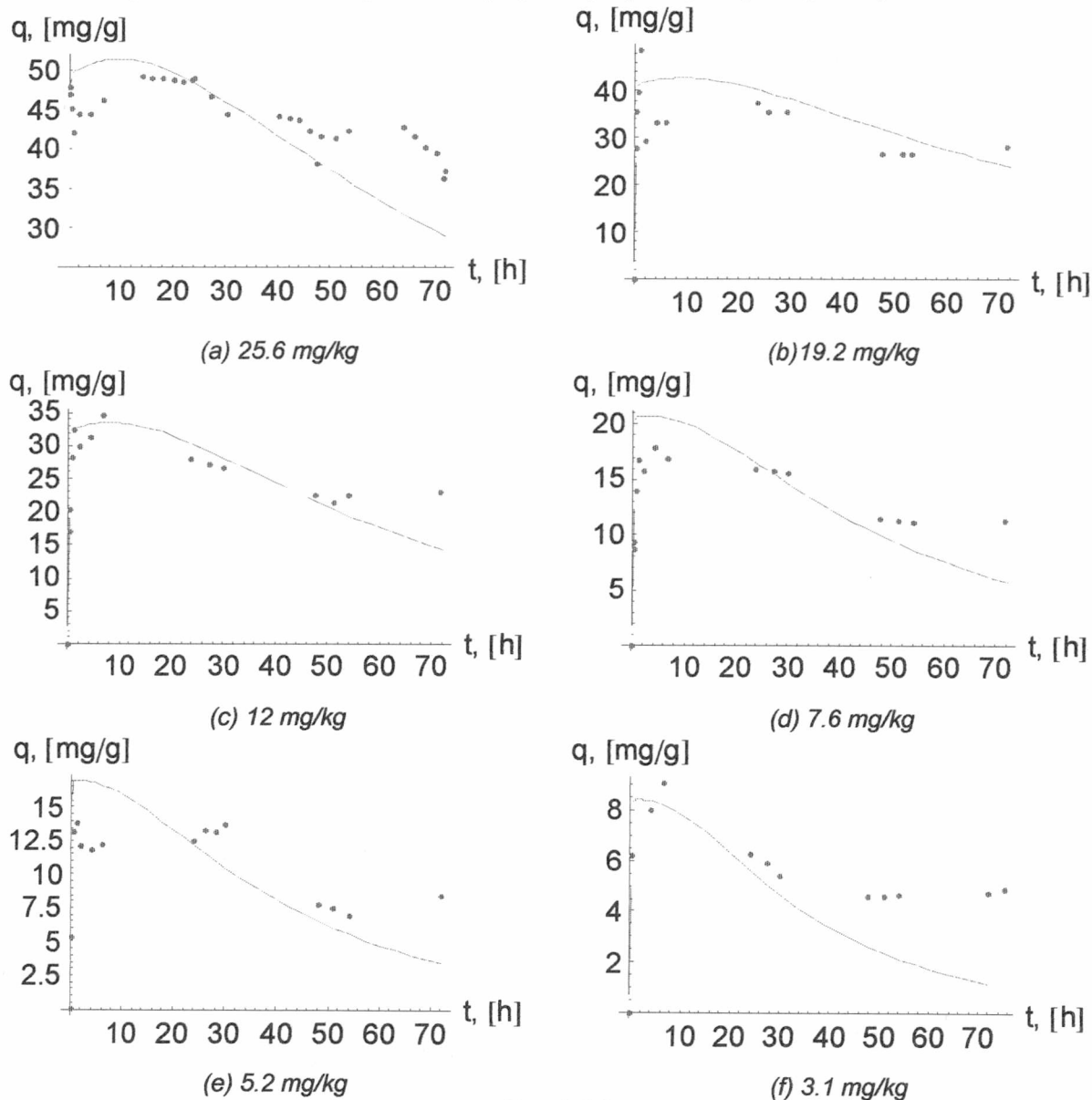
9.6 Pojemność bioakumulacyjna

Na Rys. 9.6.1 przedstawiono chwilowe q (pojemność bioakumulacyjną) [mg Me związanego przez 1 g początkowej masy komórek]. Im wyższe początkowe stężenie jonów Cr^{3+} tym wyższe wartości q . W taki sposób pojemność bioakumulacyjną definiuje literatura. Jednak bardziej prawidłowe jest rozważanie pojemności biosorpcyjnej liczonej nie w stosunku do początkowego stężenia bioakumulanta, ale wobec chwilowego jego stężenia, czyli uwzględniając przyrost biomasy. Wówczas obserwowany jest początkowy wzrost pojemności, następnie jej obniżanie jako skutek zwiększającego się stężenia komórek. Na Rys. 9.6.2 przedstawiono opis zmiany pojemności bioakumulacyjnej w czasie - wartości doświadczalne oraz modelowe (równania 9.5.1-9.5.5).



Rys. 9.6.1

Pojemność bioakumulacyjna (liczona na początkowe stężenie biomasy) jonów metali ciężkich w procesie bioakumulacji w czasie przy różnym początkowym stężeniu jonów Cr^{3+}

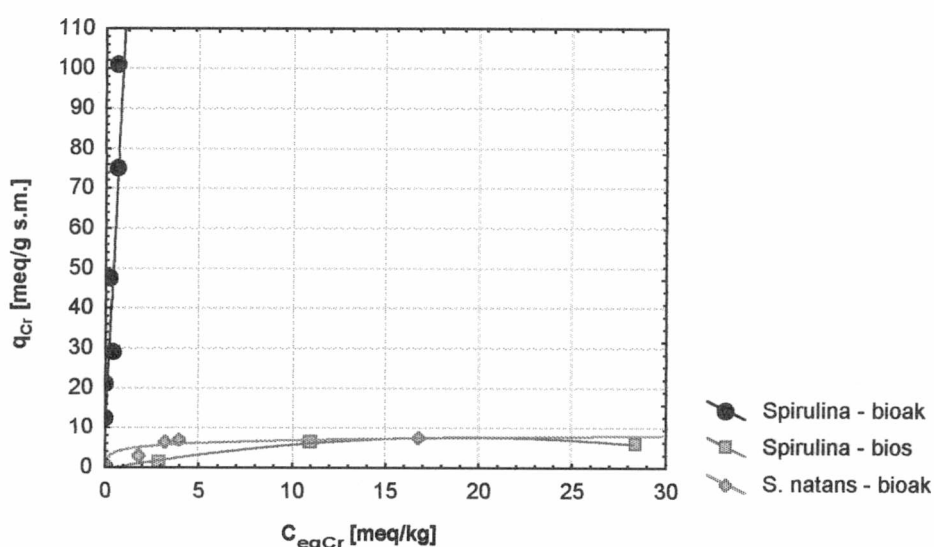


Rys. 9.6.2

Pojemność bioakumulacyjna (liczona na chwilowe stężenie biomasy) jonów metali ciężkich w procesie bioakumulacji w czasie przy różnym początkowym stężeniu jonów Cr^{3+}

Porównanie procesu bioakumulacji *Spirulina sp.* z innymi organizmami przeprowadzono dla pojemności bioakumulacyjnej liczonej na początkowe stężenie biomasy. Na Rys. 9.6.3 przedstawiono porównanie izotermy biosorpcji oraz bioakumulacji przez *Spirulina sp.* oraz *S. natans*.

W badanym zakresie stężeń jonów Cr^{3+} nie zaobserwowano efektu wysycenia komórek metalem ($q=f(C_{\text{fMe}})$ jest prostą). Przy stężeniu 5.2 mg/kg pojemność bioakumulacyjna wynosiła 20.9 mg/g X_0 , a przy 25.6 mg/kg 101.0 mg/g X_0 . Wartość pojemności biosorpcyjnej komórek mikotroficznych wynosiła natomiast odpowiednio 1.2 i 7.9 mg/g X . Pojemność bioakumulacyjna w stosunku do jonów Cr^{3+} dla *Spirulina* jest wyższa niż przykładowo dla organizmu składowego osadu czynnego *Sphaerotilus natans* [168] (Rys. 9.6.3).



Rys. 9.6.3
Izoterma biosorpcji i bioakumulacji jonów Cr^{3+} [mg Me/g X_0]

Wykorzystanie rosnącej biomasy eliminuje potrzebę stosowania oddzielnego wężła jej namnażania (hodowla, zbieranie, suszenie, procesowanie i magazynowanie). Istnieje jednak wiele poważnych ograniczeń procesu. Najważniejszym z nich jest, że jony metali ciężkich mogą powodować zahamowanie wzrostu komórek gdy stężenie jonów metalu jest zbyt wysokie. Aktywne procesy transportu jonów metalu wymagają ponadto większego zapotrzebowania energetycznego. Metale ciężkie mają wpływ na te organizmy poprzez inaktywację enzymów, oddziaływanie z transportem komórkowym, interferencje z asymilacją większości składników pokarmowych. Uważa się, że czynniki środowiskowe, takie jak natężenie światła, pH, temperatura mają silny wpływ na bioakumulację. Istnieje ścisły związek pomiędzy procesem a ilością dostępnej dla komórek energii, czyli światła i substratu organicznego (glukozy).

Podczas gdy żyjące organizmy wykorzystuje się z powodzeniem w biodegradacji zanieczyszczeń organicznych, powstaje pytanie, mając na uwadze toksyczny wpływ większości jonów metali ciężkich, czy żyjące mikroorganizmy mogą być stosowane w tego typu technologiach. Literatura poświęcona procesowi bioakumulacji jest niezwykle uboga. Nie znaleziono dyskusji dotyczącej interakcji pomiędzy metabolizmem komórkowym a obecnością jonów metali ciężkich, wpływu stężenia tych jonów na parametry kinetyczne wzrostu, interrelacji pomiędzy ilością metalu usuniętego, a przyrostem biomasy. Proces bioakumulacji jonów metali ciężkich obejmuje zmianę postaci w jakiej jon występuje, m.in. na skutek zmian sorpcyjnych, rozpuszczalności, właściwościach transportowych oraz toksyczności. Bioakumulacja jest procesem, w którym występuje zatrzymanie i koncentracja jonów metali w organizmie żywym. Jony metalu są transportowane z zewnątrz komórki, przez błonę do jej wnętrza, gdzie są wiązane i deponowane. Proces taki konsumuje energię komórkową.

10. OCZYSZCZANIE ŚCIEKÓW PRZEMYSŁOWYCH PRZEZ MIKROALGI *Spirulina sp.*

10.1 Oczyszczanie przykładowych ścieków przemysłowych

Większość ścieków przemysłowych nie zawiera organicznego źródła węgla, co ogranicza zastosowanie metod biologicznych w ich oczyszczaniu. Dlatego interesującym rozwiązaniem będzie wykorzystanie do tego celu organizmów prowadzących fotosyntezę. Ze względu na specyfikę ścieków przemysłowych (mnogość zanieczyszczeń i interakcji między nimi) bardzo trudno jest przeprowadzić symulację efektywności oczyszczania konkretnych ścieków bez prac eksperymentalnych. Podczas gdy wpływ jednego jonu metalu na proces oczyszczania ścieków zbadano szczegółowo, istnieje deficyt informacji o wpływie różnych jonów metali, obecnych w ściekach rzeczywistych. O ile proces biosorpcji w roztworach zawierających różne jony można przewidzieć (na podstawie znajomości pojemności kationowymiennej), w procesie bioakumulacji należy wziąć pod uwagę wpływ zanieczyszczeń obecnych w ściekach oraz stężeń składników pokarmowych na przyrost biomasy.

Przeprowadzono oczyszczanie przykładowych ścieków przemysłowych z zakładów produkujących miedź oraz inne metale nieżelazne. Zakłady te wytwarzają miedź rafinowaną (katodową) (93000 t/rok), walcówkę miedzianą (do produkcji kabli i drutów) oraz wlewki okrągłe (3500 t/rok) i srebro rafinowane. W procesie produkcyjnym powstają ścieki o niskim stopniu zanieczyszczenia i dużej objętości (7000 m³/d). Dotychczas zakłady prowadziły oczyszczanie metodą sedymentacji osadu oraz korekcji pH, ale proces ten okazał się nieefektywny w usuwaniu pierwiastków śladowych.

Badane ścieki były zanieczyszczone pierwiastkami w stężeniach śladowych, w szczególności nie spełniały polskich norm regulujących dopuszczalne stężenia zanieczyszczeń wprowadzanych do wód i do ziemi (Tabela 10.1.1) w stosunku do rtęci, kadmu, azotu-amonowego i arsenu (Tabela 10.1.2). Pozostałe zanieczyszczenia ścieków obecne były w stężeniach dopuszczalnych przez polskie przepisy prawne. Wartość wskaźnika ChZT ścieków (156 mg O₂/dm³) tylko nieznacznie przekraczała dopuszczalne normy (150 mg O₂/dm³).

Tabela 10.1.1

Najwyższe dopuszczalne wartości wskaźników zanieczyszczeń w ściekach w prowadzanych do wód i do ziemi [232]

Nazwa wskaźnika	Jednostka	Wartość	Nazwa wskaźnika	Jednostka	Wartość
Temperatura	°C	35	Cr(III)	mg/L	0.5
pH	6.5-8.5	6.5-9.0	Cr(VI)	mg/L	0.2
COD	mg O ₂ /L	150.0	Cd	mg/L	0.1
BOD	mg O ₂ /L	30.0	Cu	mg/L	0.5
N-amonowy	mg N-NH ₄ /L	6.0	Mn	mg/L	2.0
N-całkowity	mg N/L	30.0	Ni	mg/L	2.0
P-całkowity	mg P/L	5.0	Pb	mg/L	0.5
As	mg/L	0.2	Hg	mg/L	0.02
Ba	mg/L	10.0	Ag	mg/L	0.2
B	mg/L	1.0	V	mg/L	2.0
			Zn	mg/L	2.0

Tabela 10.1.2

Skład ścieków surowych, odwirowanych oraz poddanych oczyszczaniu przez *Spirulina sp.* w procesie bioakumulacji (przez 24 h) i odwirowania

Zanieczyszczenie	Ścieki surowe [µg/kg]	Ścieki odwirowane [µg/kg]	Ścieki oczyszczone przez <i>Spirulina sp.</i> i odwirowane [µg/kg]	Stopień oczyszczenia [%]	Pojemność bioakumulacyjna [µg zaniecz./g s.m.]
Rh	0.0846	0.0892	0.000	100	0.36
Hfl	0.7829	0.7317	0.000	100	2.93
Nb	2.1689	0.8079	0.6477	19.8	0.64
Pb	1.5159	1.160	0.0648	94.8	4.38
Zr	2.9347	2.788	0.6403	77.0	8.59
Os	6.2765	6.2765	0.0000	100	25.11
Sc	6.9756	6.3738	4.1982	34.1	8.70
Th	8.5762	8.936	0.615	93.1	33.28
Co	15.5344	14.969	11.865	20.7	12.42
Sb	42.7275	42.154	41.342	1.92	3.25
W	50.7299	50.605	5.839	88.5	179.06
Zn	307.7544	61.9788	20.4256	67.0	166.21
Ba	70.5635	70.185	56.902	18.9	53.13
Cu	144.8342	142.312	74.537	47.6	271.10
Ni	217.3885	217.741	169.213	22.3	194.11
Mn	433.2411	408.305	342.559	16.1	262.98
Re	447.2776	448.704	438.303	2.3	41.60
Cd	3811.953*	2073.658	916.657	55.8	4628.00
Hg	760.2*	551.3	215.5	60.9	1343.20
Al	36	35	15	48.6	80.00
N-amonowy	66010*	65900	602	99.1	261200
Zanieczyszczenia nie usunięte w procesie oczyszczania					
Ce	0.0000	0.0127			
La	2.1229	2.5455			
Ge	4.6472	4.4694			
Ti	9.6488	6.3023			
Cs	1027.245	9.1161			
Rb	1932.071	1022.836			
Mo	60.0	13.0			
As	9753.985*	9047.798			
P	115	114			

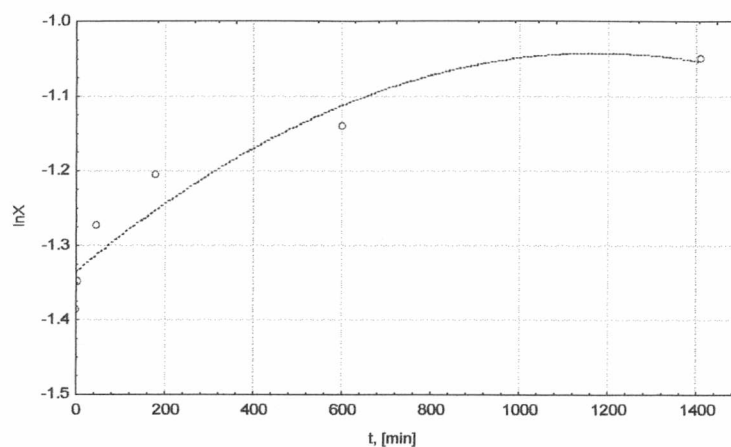
*) stężenia powyżej dopuszczalnych limitów

Przeprowadzono oczyszczanie w/w ścieków z zastosowaniem *Spirulina sp.* w procesie bioakumulacji. Proces prowadzono tak, by poniesione nakłady były możliwie najniższe, tzn. zastosowano surowe ścieki bez wzbogacania w składniki pokarmowe, nie stosowano sztucznego naświetlania. Oczyszczanie przeprowadzono w termostatowanym reaktorze mieszalnikowym (35 °C, 100 obr./min.) przez 24 godziny. Inoculum stanowiło 0.25 g liofilizatu komórek *Spirulina sp.* pH ścieków surowych wynosiło 8.5, a po procesie oczyszczania 7.5 Ścieki przed oczyszczaniem zabarwione były na jasno-żółty kolor, natomiast po oczyszczeniu były klarowne i bezbarwne. Były pozbawione odoru zarówno przed oczyszczaniem jak i po.

Stwierdzono niewielki przyrost biomasy (specyficzna szybkość wzrostu przyjmuje typowe wartości dla hodowli autotroficznej, Rys. 10.1.1, $\mu=0.021\text{ h}^{-1}$), ponieważ ścieki były ubogie w składniki odżywcze, a w szczególności nie zawierały organicznego źródła węgla. Oznaczono stopień oczyszczenia ścieków (RD) w stosunku do próby odwirowanej (C_0), zgodnie z formułą (Tabela 10.1.2):

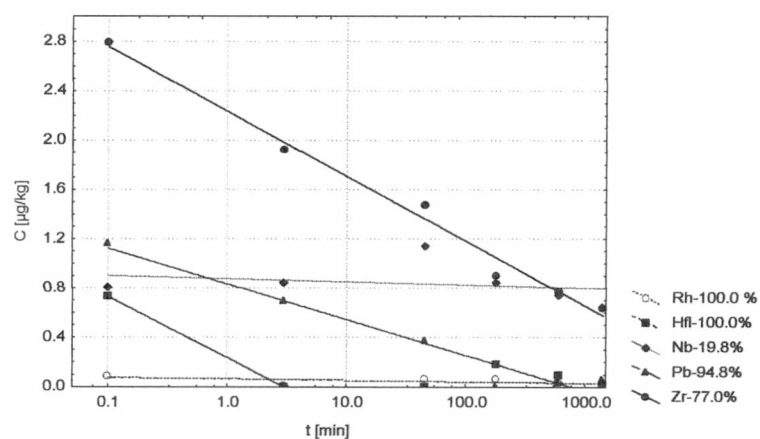
$$RD = \frac{C_0 - C_F}{C_0} \cdot 100\% \quad (10.1.1)$$

Pierwiastki śladowe, obecne w ściekach pogrupowano w zależności od stężenia początkowego. Wyniki przedstawiono na Rys. 10.1.2 (a: 0-3 µg/kg), (b: 3-15 µg/kg), (c: 15-70 µg/kg), (d: 70-500 µg/kg), (e: 550-2000 µg/kg), f(f: >2000 µg/kg) (Rys. 10.1.2). Stwierdzono, że całkowita pojemność bioakumulacyjna w stosunku do jonów metali śladowych wynosiła 7320 µg Me/g s.m (Tabela 10.1.2). Określono stopień oczyszczenia ścieków (Tabela 10.1.2), który dla poszczególnych zanieczyszczeń był bardzo różny (0-100 %). Stopień oczyszczenia >50 % uzyskano dla pierwiastków w ultra-śladowych stężeniach (Rh, Hfl, Pb, Zr) oraz śladowych stężeniach (Os, Th, W, Zn, Cu, Cd, Hg). Poniżej 20 % dla Nb, Sc, Co, Ba, Ni. Stężenie pozostałych zanieczyszczeń (Ce, La, Ge, Ti, Cs, Pb, Mo, As, P) nie zostało obniżone. Po procesie oczyszczania stężenia jonów, których poziom przekraczał dopuszczalne normy (Hg, Cd, N-amonowy) zostało obniżone do stężenia zgodnego z polskimi przepisami prawnymi, a stopień zateżnienia wynosił dla rtęci 2866, a dla kadmu 3038. Metoda ta jednak nie była efektywna w stosunku do As, którego stężenie nie zostało zmniejszone, ponieważ As był obecny w ściekach w postaci anionowej - nie podatnej na oczyszczanie zarówno w procesie biosorpcji jak i bioakumulacji. W związku z tym, dla tych konkretnych ścieków konieczne jest poszukiwanie metody wspomagającej proces bioakumulacji przez *Spirulina sp.*, usuwającej to zanieczyszczenie (np. strącanie z kationami żelaza, glinu, wapnia).

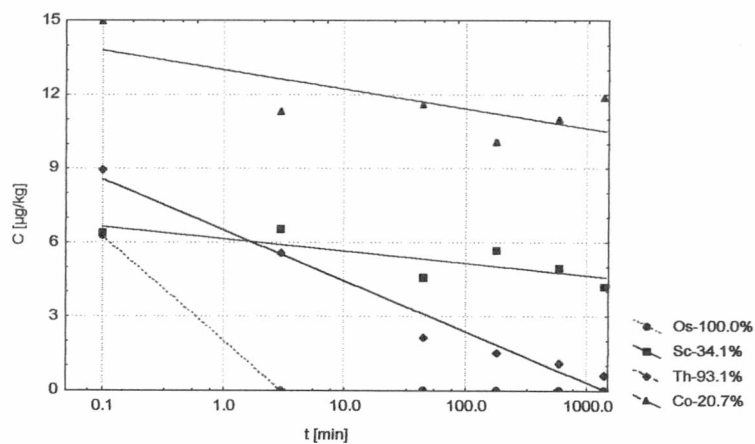


Rys. 10.1.1

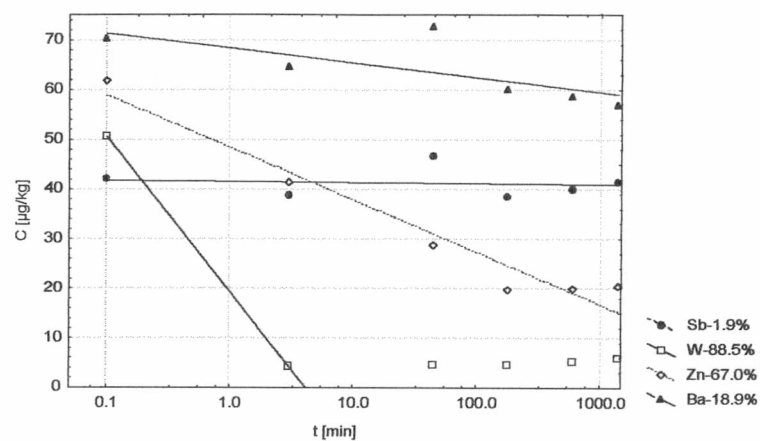
Krzywa wzrostu *Spirulina sp.* w procesie oczyszczania ścieków z zakładów przemysłowych



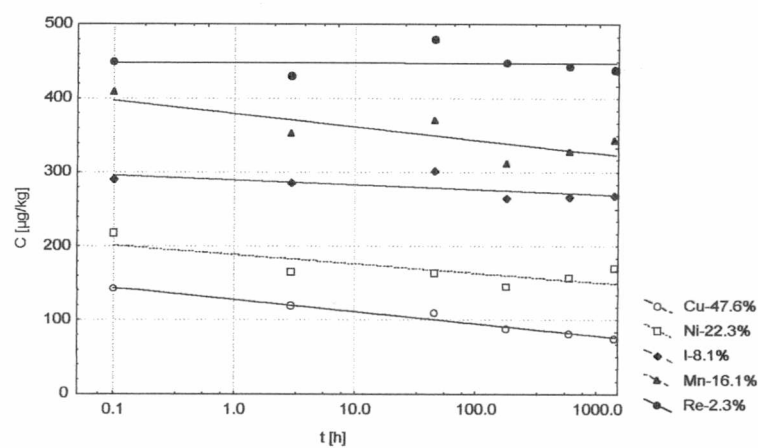
(a)



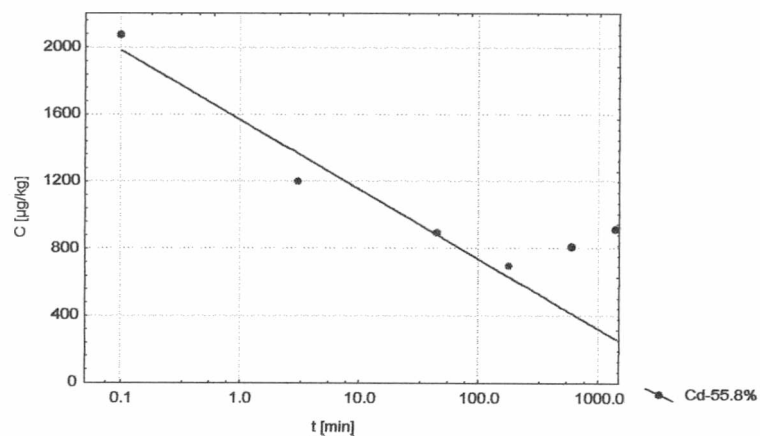
(b)



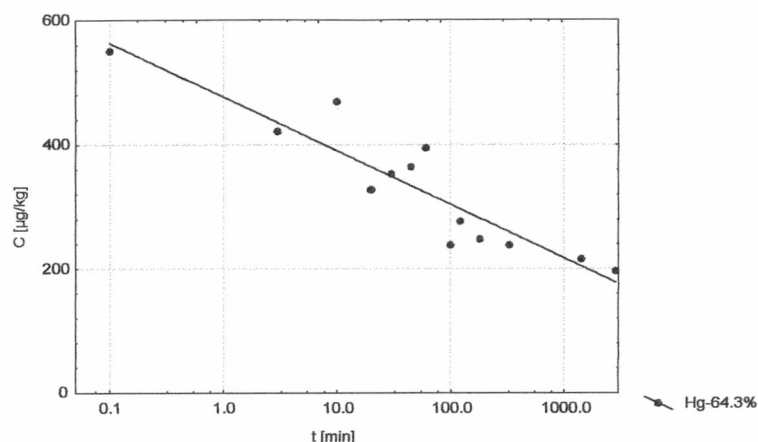
(c)



(d)



(e)



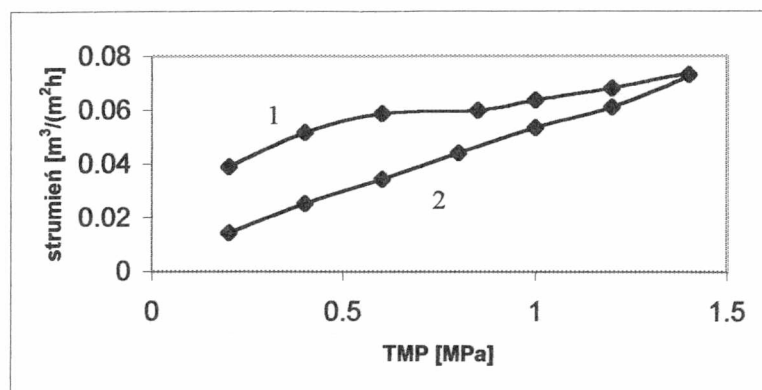
(f)

Rys. 10.1.2

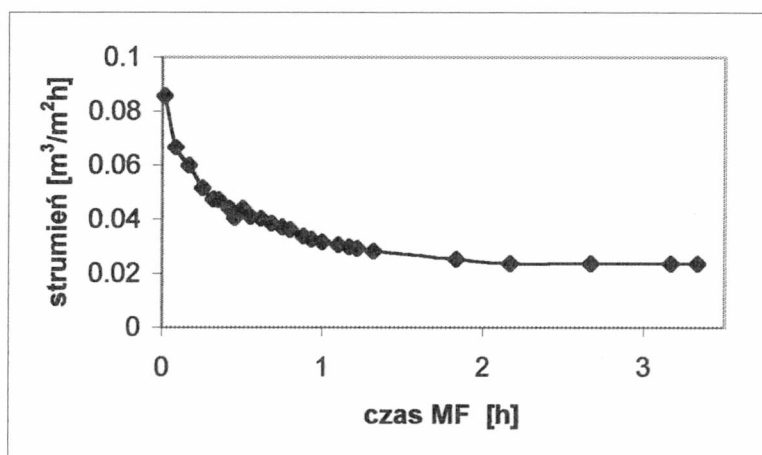
Usuwanie pierwiastków śladowych w czasie oraz stopień usunięcia danego jonu (po 24 h oczyszczania) ze ścieków pochodzących z zakładów produkujących miedź oraz metale nieżelazne

10.2 Układ separacji komórek

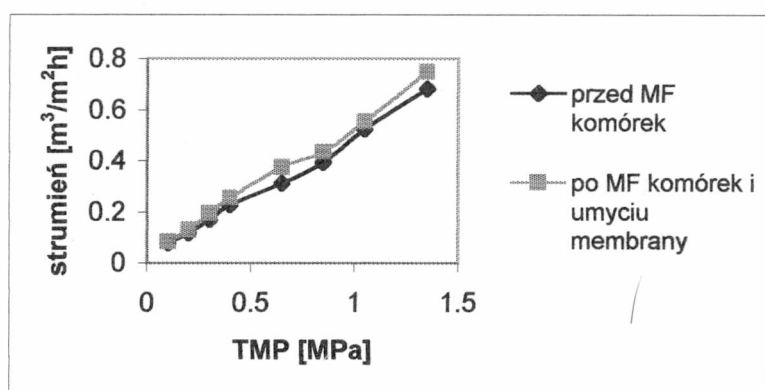
Zastosowanie mikroalg w oczyszczaniu ścieków wymaga doboru metody oddzielającej komórki. Zaproponowano wykorzystanie membran mikrofiltracyjnych do separacji biomasy od oczyszczanych ścieków. Ze względu na stosunkowo duży rozmiar komórek (30 µm długości) istnieje możliwość zastosowania membran o stosunkowo dużym rozmiarze porów. Na Rys. 10.2.1 przedstawiono podstawową charakterystykę procesu mikrofiltracji zawiesiny komórek *Spirulina sp.* Stwierdzono wystarczający rozmiar porów membrany. Zaobserwowano niekorzystne zjawisko foulingu, jednak ponieważ istnieje możliwość skutecznego odmycia membrany, problem ten będzie można zmniejszyć poprzez zastosowanie techniki przemywania wstecznego (back-flushing). Zalecane ciśnienie transmembranowe (TMP) dla procesu mikrofiltracji komórek *Spirulina sp.* powinno być możliwie najniższe, by nie doprowadzić do zniszczenia komórek - 0.2 MPa.



(a)



(b)



(c)

Rys. 10.2.1

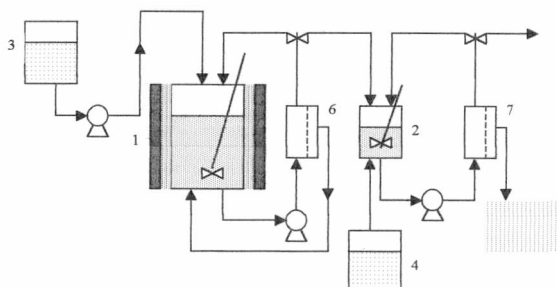
Charakterystyka oddziaływania membrany mikrofiltracyjnej z komórkami *Spirulina sp.*
 a) MF przy (1) - stopniowym zwiększaniu ciśnienia transmembranowego (TMP) (0.2-1.4 MPa) oraz (2) - zmniejszaniu (1.4-0.2 MPa), b) przepływ permeatu w czasie w układzie z zawracaniem permeatu, przy TMP 0.2 MPa, c) przepływ czystej wody przed procesem MF komórek oraz po zastosowaniu procedury mycia membrany (0.1 % Daraflox, 0.1 % NaClO, 0.1 % HCl)

10.3 Konfiguracja instalacji technologicznych oczyszczania ścieków z jonów metali ciężkich w procesach biosorpcji oraz bioakumulacji

Istotnym zagadnieniem jest konfiguracja systemów dla procesów biosorpcji oraz bioakumulacji prowadzonej przez mikroalgi *Spirulina sp.* Ze względu na naturę każdego procesu, w przypadku biosorpcji proponuje się zastosowanie układu dwu- a bioakumulacji jedno-węzłowego. W każdej z metod należy zapewnić możliwość namnażania biomasy. Produktywność oraz wydajność systemu oczyszczania ścieków z wykorzystaniem mikroalg w skali przemysłowej zależy w dużym stopniu od konstrukcji bioreaktora. Reaktor do namnażania alg powinien zapewniać krótką drogę penetracji światła. Najprostszą zastosowaną konstrukcją są otwarte, płytkie baseny. Głównymi parametrami technologicznymi są zawartość składników odżywczych, dostępność światła oraz temperatura, które powinny być kontrolowane i dostosowane do wymagań danego szczepu. Kontrola taka jest znacznie bardziej precyzyjna w zamkniętych fotobioreaktorach w procesie ciągłym, zaopatrzonym w jednostkę separacyjną - w tym konkretnym przypadku w układ z membraną mikrofiltracyjną (MF). Kolejnym istotnym zagadnieniem jest dobór stężenia biomasy. W przypadku gdy w ściekach znajduje się tylko nieorganiczne źródło węgla, komórki będą rosły na sposób autotroficzny. W tym przypadku, ze względu na istnienie bariery o podłożu fizjologicznym (we wzroście autotroficznym), maksymalne uzyskiwane stężenie komórek to 0.5 g/dm^3 .

Biosorpcja wymaga zastosowania znacznie krótszego czasu kontaktu metal-biomasa. Instalacja dla procesu biosorpcji jest bardziej kompleksowa. Proponuje się wykorzystanie instalacji zbudowanej z dwóch węzłów: I - namnażania komórek, II - biosorpcji (Rys. 10.3.1). Biomasa mikroalg jest namnażana w procesie ciągłym w fotobioreaktorze membranowym (1). Komórki są oddzielane od pożywki hodowlanej w jednostce mikrofiltracyjnej (MF) (6). Część retentatu jest przekazywana do biosorbera (2), który jest zasilany ściekami zawierającymi jony metali ciężkich (4). Dodatkowa jednostka MF (7) jest wykorzystana do oddzielenia biomasy od oczyszczanych ścieków. Ponieważ warunki prowadzenia procesu biosorpcji i namnażania biomasy są różne (namnażanie komórek trwa ok. 20 h, istnieje konieczność zastosowania fotobioreaktora o specjalnej konstrukcji, zapewniającej jednorodne natężenie światła w reaktorze oraz pożywki hodowlanej). Drugi etap - biosorpcja, jest procesem szybkim (równowaga zostaje osiągnięta w ciągu kilku minut), nie wymagającym skomplikowanej aparatury. Wystarczający tu będzie niewielki reaktor mieszalnikowy. W procesie bioakumulacji istnieje możliwość sterowania dwoma parametrami niezależnymi:

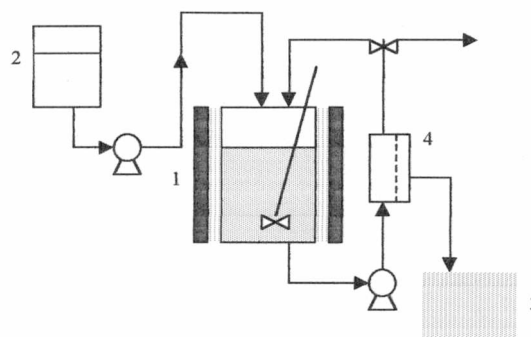
stężenie biomasy może być dobrane do aktualnego stężenia jonów metalu w ściekach. Poprzez odmycie niewielką objętością kwaśnego roztworu (np. ścieków) można usunąć jony metalu związane z powierzchnią ściany komórkowej alg uzyskując ścieki o wysokim stopniu zanieczyszczenia i małej objętości, które można następnie oczyścić metodami tradycyjnymi. Zregenerowaną biomasę będzie można wykorzystać ponownie.



Rys. 10.3.1

Schemat procesu usuwania jonów metali ciężkich w procesie biosorpcji w instalacji dwu-węzłowej: I - namnażanie biomasy, II - biosorpcja; 1 - fotobioreaktor do hodowli mikroalg, 2 - biosorber, 3 - zbiornik z pożywką hodowlaną, 4 - zbiornik ze ściekami zawierającymi jony metali ciężkich, 5 - zbiornik z oczyszczanymi ściekami, 6, 7 - jednostki mikrofiltracyjne

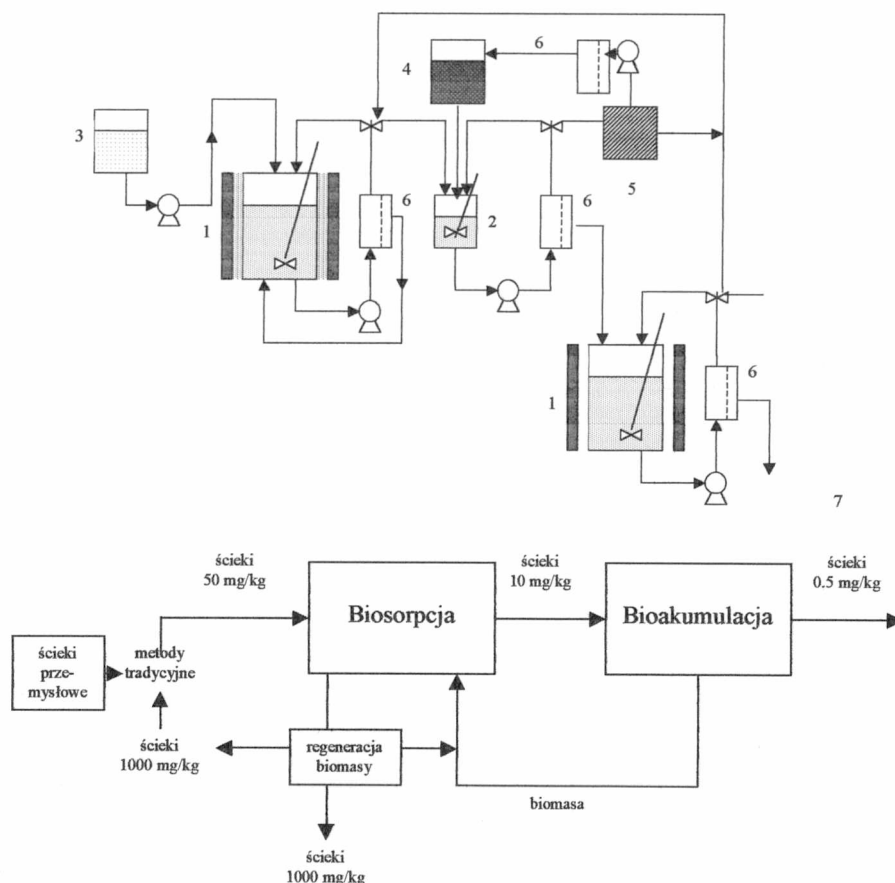
Bioakumulacja może zostać z powodzeniem zastosowana do oczyszczania ścieków zawierających oprócz jonów metali również inne zanieczyszczenia, takie jak związki węgla (organiczne i nieorganiczne), azotu, fosforu, siarki, które są źródłem tych pierwiastków do budowy biomasy. W procesie bioakumulacji stopień oczyszczenia ścieków z jonów metali jest wyższy niż w procesie biosorpcji, gdyż jony te znajdują się nie tylko na powierzchni komórek, ale również w ich wnętrzu. Dodatkowo, biomasa zostaje namnożona. W procesie bioakumulacji wiązanie jonów metali i przyrost biomasy przebiegają jednocześnie - w tym samym miejscu i czasie. Zaletą procesu jest, że reaktor w którym następuje namnażanie biomasy jest również miejscem wiązania jonów metalu - proces jest jednoetapowy. Usuwanie jonów metali przebiega znacznie wolniej w porównaniu do układu wykorzystującego biosorpcję. Równowaga zostaje ustalona w ciągu 20 h. Ze względu na niską szybkość procesu konieczne jest zastosowanie aparatury o większych gabarytach w porównaniu do procesu biosorpcji. Proponowana jest zatem technologia jedno-węzłowa: komórki są namnażane w ściekach zawierających zarówno jony metali ciężkich jak i składniki odżywcze. Proces przebiega w fotobioreaktorze z membraną mikrofiltracyjną (Rys. 10.3.2).



Rys. 10.3.2

Schemat jedno-węzłowego procesu oczyszczania ścieków wykorzystującego bioakumulację; 1 - fotobioreaktor do hodowli mikroalg, 2 - zbiornik ze ściekami zawierającymi jony metali ciężkich, 3 - zbiornik z oczyszczonymi ściekami, 4 - jednostka mikrofiltracyjna;

Procesy biosorpcji i bioakumulacji można również **połączyć** (Rys. 10.3.3). Ścieki oczyszczone metodami tradycyjnymi (stężenie jonów metali ciężkich ~ 50 mg/kg) są oczyszczane w procesie biosorpcji (do poziomu ~ 10 mg/kg), a następnie bioakumulacji (do stężenia ~ 0.5 mg/kg). Namnożona w procesie bioakumulacji biomasa jest następnie przekazywana jako biosorbent do procesu bioakumulacji, a związana z metalem biomasa z procesu biosorpcji jest regenerowana. W procesie regeneracji powstają ścieki o wysokim stopniu zanieczyszczenia, który może zostać oczyszczony metodami tradycyjnymi.



Rys. 10.3.3

Propozycja technologii oczyszczania ścieków w procesie opartym o połączenie biosorpcji, bioakumulacji i metod tradycyjnych; 1-fotobioreaktor, 2-biosorbent, 3-zbiornik z pożywką, 4-zbiornik ze ściekiem, 5-węzeł regeneracji biomasy, 6-membrana mikrofiltracyjna

11. PODSUMOWANIE

Przedstawione wyniki badań pozwoliły na zaproponowanie dwóch nowych metod usuwania jonów metali ciężkich ze ścieków przemysłowych o niskim stężeniu i dużej objętości. Założenia procesowe tych metod zgodne są z obowiązującymi kryteriami ochrony środowiska, pozwalając skutecznie zateżyć jony do formy mniej oddziałującej na środowisko oraz nadającej się do powtórnego przetworzenia. Jednocześnie, w przypadkach gdy w ściekach dodatkowo znajdują się inne zanieczyszczenia, takie jak związki węgla, azotu czy siarki, stosowane metody są również wydajne w ich usuwaniu.

11.1 Hodowla biomasy

I. Metabolizm

1. Mikroalgi *Spirulina sp.*, w naturalnych warunkach rosnące w jeziorach (m.in. Texcoco, Meksyk), czyli wykorzystujące światło słoneczne do prowadzenia fotosyntezy, mogą być hodowane w warunkach sztucznych: w fotobioreaktorze naświetlanym białymi lampami fluorescencyjnymi, co zapewniło w pełni kontrolowane warunki pomiarowe. Fotobioreaktor skonstruowano tak, by droga penetracji światła była możliwie krótka, w celu zapewnienia komórkom w miarę jednorodnego natężenia.
2. Komórki *Spirulina sp.* jako nieliczne spośród prokariota i mikroalg mogą rosnąć z wykorzystaniem trzech różnych metabolizmów: autotrofii, heterotrofii oraz, składającej się z auto- i hetero-: miksotrofii, które wykorzystują różne źródła węgla i energii. Przy dostępie światła i braku substratu organicznego komórki rosną na sposób autotroficzny, przy braku dostępu do światła, a w obecności substratu organicznego (tu: glukozy) są tlenowymi heterotrofami. Natomiast gdy w ich środowisku życia znajduje się światło oraz substrat organiczny, są miksotrofami.
3. Stwierdzono, że *Spirulina* jest miksotrofem właściwym: komórki jednocześnie prowadzą oksydacyjne utlenianie glukozy (heterotrofia) i fotosyntetyczną asymilację dwutlenku węgla (autotrofia) - gdyż nie stwierdzono zjawiska diauksji. Procesy te wpływają na siebie i nie działają niezależnie. Podstawowym metabolizmem jest autotrofia, która jest wspomagana przez heterotrofię (czyli glukozę).

II. Substraty limitujące wzrost

4. W każdym metabolizmie inne są substraty limitujące wzrost: w przypadku autotrofii - światło, heterotrofii - glukoza, miksotrofii - światło i glukoza.

5. Przy prowadzeniu hodowli tych mikroalg konieczne było uwzględnienie specyfiki każdego z substratów: światła jako substratu fizycznego oraz glukozy jako substratu chemicznego. Podczas gdy glukoza jest substratem jednorodnie dystrybuowanym w reaktorze, natężenie światła jest niejednorodne. Komórki podlegają pulsacyjnym zmianom natężenia światła. Jednak częstotliwość tych zmian jest wysoka na tyle, że komórki odbierają jedynie średnie natężenie, w związku z tym $\bar{\mu} = f(\bar{I})$.

III. Hodowle auto-, hetero- oraz miksotroficzne

Przeprowadzono 4 serie pomiarowe, w których zmieniano natężenie światła (I) oraz początkowe stężenie glukozy (C_{0Gl}):

- I. - A(I) - autotrofia - $I = 8-65 \text{ W/m}^2$, $C_{0Gl} = 0 \text{ g/dm}^3$
- II. - H(Gl)- heterotrofia- $I = 0 \text{ W/m}^2$, $C_{0Gl} = 0.1-10 \text{ g/dm}^3$
- III. - M(I) - miksotrofia- $I = 8-65 \text{ W/m}^2$, $C_{0Gl} = 2.5 \text{ g/dm}^3$
- IV. - M(Gl)- miksotrofia - $I = 32.7 \text{ W/m}^2$, $C_{0Gl} = 0.1-10 \text{ g/dm}^3$

Określono wpływ parametrów hodowli (natężenie światła, stężenie glukozy) na specyficzną szybkość wzrostu w każdej z hodowli oraz współczynniki wydajności.

IV. Specyficzna szybkość wzrostu w funkcji stężenia substratów limitujących wzrost

Hodowla fotoautotroficzna:

6. W odróżnieniu od literaturowych modeli inhibicyjnych (w szczególności: fotoinhibicyjnych), zaproponowany model wzrostu dla hodowli fotoautotroficznej ma charakter krzywej łamanej, co umożliwia jednocześnie uwzględnienie trzech obszarów na krzywej $\mu_m = f(I_{sr})$ (7.1.6):

- 1) szybkość wzrostu jest proporcjonalna do natężenia światła (zgodnie z prawem równoważników chemicznych Einstein'a): obszar limitacji światłem,
- 2) istnieje zakres wysycającego natężenia światła, w którym $\mu_m = \mu_{max}$ (szybkość absorpcji fotonów $\geq$ szybkość fazy jasnej fotosyntezy): obszar wysycenia światłem,
- 3) obszar inhibicji światłem (gdy szybkość absorpcji fotonów $\gg$ szybkość fazy jasnej fotosyntezy).

Hodowla heterotroficzna:

7. W hodowli heterotroficznej przeprowadzono analizę wpływu dwóch substratów: glukozy i azotu na wzrost. Wyznaczono parametry kinetyczne równania Monoda dla glukozy (7.2.2). Powyżej stężenia 0.5 g/dm^3 glukoza przestaje być substratem limitującym wzrost. Wpływ azotu na specyficzną szybkość wzrostu również opisano równaniem Monoda (7.2.2). Ponieważ obydwa substraty są niezbędne do wzrostu, wartość maksymalnej

specyficznej szybkości wzrostu jest w obu przypadkach jednakowa. Powyżej stężenia 0.2 g/dm^3 stężenie azotu przestaje być limitujące. W związku z tym zaproponowano opis kinetyki multiplikatywnej, dwusubstratowej (7.2.1). Kolejne hodowle prowadzono w obszarze wysycającego stężenia azotu.

Hodowla miksotroficzna

8. Miksotroficzna specyficzna szybkość wzrostu, to iloczyn funkcji zależnej od C_{GI} oraz μ^A (która zależy od I). Zarówno glukoza jak i światło mają stymulujący wpływ na wzrost (maksymalnie 2.4 razy). Nie stwierdzono inhibicji substratowej. Odpowiednie do hodowli wartości parametrów to: stężenie glukozy 2.5 g/dm^3 , natężenie światła $30\text{-}40 \text{ W/m}^2$ (7.3.2).
9. Przy wysokich wartościach natężenia światła w hodowli autotroficznej ($I > 50 \text{ W/m}^2$) zaobserwowano hamujący wpływ światła (fotoinhibicja) na μ . W hodowli miksotroficznej efekt fotoinhibicji nie występuje. Zaobserwowano jednak wysycenie światłem. Mechanizm może być różny. Jedną z możliwości jest zwiększenie wartości krytycznego natężenia światła, inną - ochronny wpływ glukozy.
10. W hodowli fototroficznej końcowe stężenie biomasy jest bardzo niskie, rzędu 0.4 g/dm^3 , ze względu na blokadę adaptacyjną o naturze fizjologicznej. Wyższe stężenia biomasy mogą zostać osiągnięte jedynie przy prowadzeniu hodowli hetero- oraz miksotroficznej (przy $I > 30 \text{ W/m}^2$).
11. W przypadku hodowli *Spirulina sp.*, I_{sr} w której zaobserwowano fotoinhibicję (jako obniżenie obserwowanej szybkości wzrostu) to $I > 50 \text{ W/m}^2$. Aby uniknąć problemu zarówno fotoinhibicji, jak i limitacji światłem, hodowlę fototroficzną mikroalg *Spirulina* należy prowadzić przy wysycającym natężeniu światła (poza obszarem limitacji i inhibicji) czyli przy $I_{sr} = 30\text{-}50 \text{ W/m}^2$. W hodowli miksotroficznej I powinno być większe niż 30 W/m^2 .
12. Stwierdzono, że odpowiednie stężenia substratów chemicznych limitujących do prowadzenia hodowli heterotroficznej i miksotroficznej są następujące: $C_{oGI} = 2.5 \text{ g/dm}^3$, $C_{oN} = 0.4 \text{ g/dm}^3$. W takich warunkach $\mu = \mu_{max}$, po zakończeniu hodowli substraty nie są obecne w pożywce, współczynnik wydajności biomasy względem azotu jest maksymalny, a glukozy relatywnie wysoki.

V. Skład elementarny oraz wartość opałowa komórek

13. Określono skład elementarny biomasy, który posłużył do oznaczenia teoretycznej entalpii spalania oraz pozwolił na precyzyjne określenie stopnia wbudowania makroskładników w biomasę. Skład pierwiastkowy komórek auto-, hetero- oraz miksotroficznych jest

różny. Największe różnice odnotowano w zawartości tlenu: najmniej tlenu zawierały komórki heterotroficzne (prawdopodobnie jako skutek deficytu tlenu w tej hodowli), następnie miksotroficzne, a najwięcej autotroficzne. Im mniejsza zawartość tlenu tym wyższa entalpia spalania komórek. Największą entalpią charakteryzują się komórki miksotroficzne (które zostały wyhodowane w obecności dwóch źródeł energii), następnie heterotroficzne i autotroficzne.

biomasa	autotroficzna	heterotroficzna	miksotroficzna
skład C-mola	$\text{CH}_{1.73}\text{O}_{0.38}\text{N}_{0.18}\text{S}_{0.10}$	$\text{CH}_{1.60}\text{O}_{0.20}\text{N}_{0.19}\text{S}_{0.10}$	$\text{CH}_{1.76}\text{O}_{0.25}\text{N}_{0.20}\text{S}_{0.097}$
masa C-mola [g/C-mol]	28.5	28.0	27.8
stopień redukcji γ	4.23	4.43	4.47
teoretyczna entalpia [kJ/g]	16.8	17.9	18.2

VI. Współczynniki wydajności biomasy względem substratów (glukozy oraz azotu) oraz wydajność bioenergetyczna

Hodowla fotoautotroficzna:

14. Określono wpływ warunków świetlnych na współczynniki wydajności biomasy względem substratów. $Y_{X/N}$ zmienia się wyraźnie z I_{sr} (rośnie). Im więcej światła, tym większy stopień wykorzystania azotu. Nie odnotowano wpływu I na Y_{X/CO_2} . Wykorzystanie zarówno N jak i CO_2 jest niewielkie (20-30%).
15. Wydajność bioenergetyczna, określająca stopień wykorzystania energii świetlnej do syntezy biomasy w procesie fotosyntezy, z reguły u organizmów fotosyntetycznych jest bardzo niska (kilka %, mg biomasy/kJ). Stwierdzono wpływ natężenia światła na wydajność bioenergetyczną: im wyższe I tym niższe Y_{kJ}^A . W przypadku dużego natężenia światła, nie ma potrzeby syntezy dużej ilości barwników fotosyntetycznych, stąd ich niższe stężenie przy dużych I , a konsekwencją tego jest mniejsza wydajność wykorzystania energii świetlnej.

Hodowla heterotroficzna:

16. W hodowli *Spirulina sp.* wartości współczynników wydajności biomasy względem substratów (glukozy i azotu), są stałe podczas trwania hodowli, ale zmieniają się w zależności od początkowego stężenia glukozy. W związku z tym również, stosunek szybkości produkcji biomasy do konsumpcji substratów nie jest stały i zależy od warunków początkowych.
17. Współczynnik wydajności biomasy względem glukozy i azotu maleje ze wzrostem początkowego stężenia glukozy. Świadczy to o niegospodarnym metabolizmie w przypadku nadmiaru glukozy. Część glukozy przeznaczana jest na syntezę biomasy, na

cele metaboliczne (podtrzymanie, denitryfikacja), pozostała część natomiast zostaje rozproszona w postaci ciepła. Podobnie w przypadku azotanów, których część wykorzystywana jest na syntezę biomasy. Duża część jest tracona w procesie denitryfikacji (redukcja azotu azotanowego do azotu molekularnego). Im wyższe początkowe stężenie glukozy, tym mniejszy współczynnik $Y_{X/N}$ - tym większy udział denitryfikacji. $Y_{X/N}$, podobnie jak $Y_{X/Gl}$ maleje ze wzrostem początkowego stężenia glukozy.

Hodowla miksotroficzna

18. Analiza wartości współczynnika wydajności bioenergetycznej Y_{kJ} metabolizmu autotroficznego, heterotroficznego i miksotroficznego pozwala na obserwację w jakich warunkach (natężenie światła, stężenie glukozy) który metabolizm dominuje, który z substratów jest efektywniej wykorzystywany i w jakich warunkach energia dostarczona komórkom jest przez nie najwydajniej wykorzystywana. Współczynnik bioenergetyczny w hodowli miksotroficznej jest zawsze wyższy niż w hodowli autotroficznej, co świadczy o wyprodukowaniu większej ilości biomasy w stosunku do ilości energii dostarczonej (w postaci światła i związku organicznego). Ze wzrostem natężenia światła maleje wartość współczynnika wydajności Y_{kJ} dla hodowli miksotroficznej i autotroficznej. Zmiana początkowego stężenia glukozy do poziomu 1 g/dm^3 powoduje zwiększenie efektywności bioenergetycznej. Przy początkowym stężeniu substratu organicznego $>2.5 \text{ g/dm}^3$ współczynniki maleją.
19. Im wyższe wartości I w hodowli miksotroficznej tym wyższa wartość współczynnika $Y_{X/N}$ (0.8-2.4), w hodowli autotroficznej współczynnik ten również rośnie, i jest wyższy niż w miksotroficznej (1.4-2.1). Jeżeli denitryfikacja ma miejsce przy niskich wartościach $Y_{X/N}$, to najwięcej strat azotu będzie w hodowli miksotroficznej przy niskim I , natomiast azot będzie wykorzystany najbardziej wydajnie przy wysokim natężeniu światła w hodowli autotroficznej.
20. Wyższa wartość teoretycznej entalpii spalania biomasy miksotroficznej wskazuje, że w warunkach gdy komórki mają dostęp do dwóch źródeł energii, syntezowana jest biomasa jest wysokoenergetyczna. Zarówno ze wzrostem natężenia światła jak i stężenia glukozy maleje wartość współczynnika wydajności Y_{kJ} .

VII. Zawartość barwników fotosyntetycznych

21. Stężenie komórkowe barwników fotosyntetycznych zależy zarówno od formy metabolizmu jak i natężenia światła. W hodowli autotroficznej zawartość pigmentów fotosyntetycznych rośnie przy wzroście I , natomiast w miksotroficznej pozostaje stałe. W

komórkach miksotroficznych znajduje się również mniej pigmentów. Ich stężenie komórkowe maleje ze wzrostem początkowego stężenia glukozy. Zawartość barwników fotosyntetycznych jest niższa w hodowli miksotroficznej niż autotroficznej i heterotroficznej.

11.2 Biosorpcja

1. Wyniki doświadczeń nad biosorpcją jonów Cr^{3+} , Cd^{2+} oraz Cu^{2+} przez *Spirulina sp.* wykazały, że organizm ten posiada większą pojemność biosorpcyjną w porównaniu do innych mikroorganizmów (Tabela 2.2.1).
2. Biosorpcję opisano jako proces równowagowy I-rzędu. Wyznaczono stałe szybkości reakcji dla każdego z badanych kationów.
3. Równowagę procesu opisano równaniem Langmuira. Wyznaczono maksymalną pojemność biosorpcyjną. Stwierdzono, że komórki *Spirulina* namnożone w różnych warunkach świetlnych i glukozowych posiadają różną charakterystykę biosorpcyjną. Biomasa miksotroficzna i heterotroficzna posiada bardzo zbliżoną charakterystykę, gorszą niż formy A i R. Stwierdzono, że liofilizat *Spirulina* posiada największą pojemność biosorpcyjną w stosunku do Cr^{3+} (185 mg/g) i Cu^{2+} (196 mg/g), natomiast fotoautotroficzna forma dla Cd^{2+} (159 mg/g).

*Maksymalne pojemności biosorpcyjne $q_{\max}$ [mg Me/g s.m.]
poszczególnych form morfologicznych *Spirulina sp.**

	Cr	Cd	Cu
R	185.47	99.47	195.90
H	43.33	27.09	42.01
M	38.48	43.56	33.30
A	121.85	159.05	127.64

4. Zaskakująco, niska powierzchnia adsorpcyjna komórek oraz słaby wpływ temperatury na efektywność procesu wskazały, że fizyczna adsorpcja nie jest dominującym mechanizmem biosorpcji.
5. Wykazano również, że podczas biosorpcji jonów metali ciężkich przez *Spirulina sp.* następuje uwalnianie pewnych kationów do roztworu (Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Fe^{3+}). Okazało się, że dominującym mechanizmem biosorpcji jest wymiana jonowa, a biomasa posiada charakterystykę podobną do słabo kwaśnych materiałów kationowymiennych.
6. Przedstawiono dowody, że na powierzchniach biologicznych znajdują się aktywne grupy funkcyjne o właściwościach kationowymiennych. Ich typ oraz stężenie zależały od morfologicznej formy komórek mikroalg *Spirulina*, ze względu na różnice w budowie

ściany komórkowej. Deprotonacja każdego rodzaju grupy funkcyjnej również zmieniała się pomiędzy formami, co sugeruje, że wartości pK_a zależą nie tylko od rodzaju danej grupy, ale również od jej mikrootoczenia, czyli pozostałych komponentów ściany komórkowej.

7. Zaobserwowano istnienie trzech różnych grup funkcyjnych znajdujących się na powierzchni komórek, zdolnych do wiązania jonów metali: karboksylowej (pK_a 2.1-2.7), fosforylowej (pK_a 6.8-7.3) oraz aminowej (pK_a 10.8-11.7). Blokada grup fosforylowych i karboksylowych, jak również aminowych spowodowała obniżenie zdolności kationowymiennych (na podstawie miareczkowania) oraz pojemności biosorpcyjnej (na podstawie doświadczeń biosorpcyjnych) w ilości odpowiadającej ich stężeniu komórkowemu.
8. Stwierdzono, że w biosorpcji biorą udział głównie grupy karboksylowe i fosforylowe, w znacznie mniejszym stopniu zaś aminowe. Prawdopodobnie na skutek zmniejszającego się w czasie stężenia jonu metalu w roztworze, a wzrastającego stężenia innych kationów, kationy te zostają przesunięte z grup karboksylowych i fosforylowych na aminowe.
9. Analiza stężenia jonów metali ciężkich w funkcji pH umożliwiła wyznaczenie stałych wiązania metal-biomasa oraz stężenia komórkowego grup biorących aktywny udział w wiązaniu jonów metalu. Potwierdziło to hipotezę dotyczącą istnienia trzech grup funkcyjnych biorących aktywny udział w wiązaniu jonów.
10. Doświadczenia desorpcyjne wykazały, że metal związany z biomasą może zostać całkowicie usunięty przy pomocy roztworu $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HNO}_3$, z jednoczesnym zachowaniem właściwości biosorpcyjnych biomasy.
11. Mając na uwadze, że biomasa jest namnażana do celów biosorpcyjnych, produktem będzie nie tyle sama ilość biomasy, czy zawartość barwników fotosyntetycznych, ale przede wszystkim pojemność biosorpcyjna komórek, czyli liczba miejsc wiążących jony metali ciężkich.
12. Stwierdzono, że parametry hodowli mikroalg (natężenie światła, stężenie glukozy) mają wpływ na przydatność biomasy do celów biosorpcyjnych. W obecności większych stężeń glukozy syntezowane są komórki o mniejszej pojemności biosorpcyjnej, natomiast zwiększenie natężenia światła powoduje zwiększenie pojemności biosorpcyjnej.
13. Zaobserwowano, że komórki namnożone z wykorzystaniem pojedynczych metabolizmów (auto- i heterotrofii) charakteryzują się większą pojemnością biosorpcyjną niż komórki wyhodowane w metabolizmie mieszanym (miksotroficznym). Biomasa miksotroficzna posiada mniejsze zdolności biosorpcyjne niż autotroficzna. W przypadku

biomasy miksotroficznej nie stwierdzono wpływu światła na pojemność biosorpcyjną. Taki wpływ zaobserwowano natomiast dla biomasy autotroficznej, której zdolności biosorpcyjne rosły wraz ze wzrostem natężenia światła. Im wyższe początkowe stężenie glukozy tym wyższe stężenie komórek, ale komórek o mniejszej pojemności biosorpcyjnej.

14. Komórki *Spirulina sp.* mogą być zatem uznane za naturalne materiały o właściwościach kationowymiennych, zawierających grupy o charakterze słabo kwaśnym i zasadowym. Wiązanie kationów metali ciężkich zależy od stanu dysocjacji tych grup i charakteryzuje się wysoką specyficznością.

11.3 Bioakumulacja

1. Obecność jonów Cr^{3+} (w stężeniu $<26 \text{ mg/kg}$) spowodowała zmniejszenie szybkości wzrostu, ale nie spowodowała jego całkowitego zaniku.
2. W obecności jonów Cr^{3+} komórki *Spirulina sp.* prowadzą proces bioakumulacji.
3. Wydajność syntezy biomasy uległa obniżeniu, zarówno względem glukozy, jak i azotu, co świadczy o dodatkowych nakładach energetycznych na wprowadzanie jonów do wnętrza komórek podczas bioakumulacji. Oczyszczanie ścieków z innych niż jony metali składników (azotanów, węgla organicznego) jest zjawiskiem interesującym pod względem aplikacyjnym.
4. Dwukrotne obniżenie wartości współczynnika wydajności syntezy biomasy oraz współczynnika wydajności bioenergetycznej wskazuje, że ok. 50 % skonsumowanej energii wykorzystywane jest na syntezę biomasy, a pozostałe 50 %, na procesy związane z bioakumulacją: transport jonów metalu do wnętrza komórki i deponowanie wewnątrz. Transport jonów chromu do wnętrza komórki, zatem jest procesem aktywnym - konsumującym energię, co znajduje odzwierciedlenie właśnie w zmniejszonej wartości współczynników wydajności biomasy względem glukozy, azotu oraz wydajności bioenergetycznej.
5. Zaobserwowano istnienie korelacji pomiędzy stężeniem komórkowym chlorofilu, a wydajnością bioenergetyczną. Na skutek obecności jonów metalu maleje stężenie komórkowe barwników fotosyntetycznych. Konsekwencją tego jest zmniejszenie intensywności fotosyntezy oraz wydajności bioenergetycznej. Można zatem przypuszczać, że obecność jonów metalu powoduje zaburzenia metaboliczne głównie poprzez interakcje z procesem fotosyntezy.

6. Jeżeli komórki są namnażane w obecności jonów metali, wymagania energetyczne metabolizmu są większe, ponieważ część energii jest przekazywana na wprowadzanie jonów metalu do wnętrza komórki. Prawdopodobnie obniżenie wydajności bioenergetycznej ma wpływ na zmniejszenie specyficznej szybkości wzrostu w obecności jonów metalu - zaobserwowano liniową korelację pomiędzy μ_m a Y_{KJM} .
7. Bioakumulacja to proces składający się z 2 etapów: 1 – biosorpcja (etap szybki, niezależny od metabolizmu i temperatury), 2 – bioakumulacja (etap znacznie wolniejszy od biosorpcji, ściśle zależny od metabolizmu komórkowego).
8. Zaproponowano model procesu bioakumulacji w oparciu o zidentyfikowany mechanizm procesu. Bioakumulację rozpatrywano jako proces składający się z dwóch reakcji następczych: 1) wiązanie do ściany komórkowej, 2) transport do wnętrza komórki. Przyjęto, że są to reakcje równowagowe. Biorąc pod uwagę mechanizm procesu, czyli istnienie dwóch następczych reakcji, w których jony metalu są wiązane do powierzchni komórek a następnie transportowane z powierzchni do wnętrza komórek. Zaproponowano równania opisujące zmianę stężenia rozpuszczonej formy metalu, związanej z powierzchnią komórki i znajdującej się w jej wnętrzu.
9. Na podstawie opracowanego modelu możliwe było również opisanie zmian pojemności bioakumulacyjnej w czasie.
10. Czas kontaktu w procesie bioakumulacji powinien wynosić 24 h, podczas biosorpcji 0.5 h. Pojemność bioakumulacyjna komórek miksotroficznych jest większa niż pojemność biosorpcyjna. W procesie bioakumulacji jony metalu znajdują się nie tylko na powierzchni komórki, ale również w ich wnętrzu. Dodatkowo, biomasa jest namnażana, a zatem zwiększa się powierzchnia wiążąca jony oraz dostęp do wnętrza komórek dla jonów metalu. Zewnętrzna pojemność w procesie bioakumulacji jest mniejsza niż w biosorpcji jako skutek wprowadzenia jonów metalu do wnętrza komórki oraz namnożenia biomasy. Dzięki temu stan równowagi $q=f(C_{Me})$ zostaje przesunięty w kierunku niższych wartości C_{Me} - stopień usunięcia jonów metalu jest większy niż w procesie biosorpcji.

11.4 Oczyszczanie ścieków przemysłowych

1. Rozważano dwa procesy oczyszczania ścieków z jonów metali ciężkich: biosorpcji (wykorzystującej nieżyjącą, uprzednio namnożoną biomasę) i bioakumulacji (wykorzystującą żyjącą biomasę). Obydwa procesy wymagają etapu namnażania komórek - prowadzonego w specjalnie zaprojektowanych do tego celu fotobioreaktorach, zapewniających jednorodne warunki natężenia światła oraz pełne przemieszanie (krótka

droga penetracji światła, w celu uniknięcia efektu samo-zacieniania), zapewnienia odpowiedniej temperatury oraz obecności składników pokarmowych. W najprostszym przypadku proces może przebiegać w płytkich otwartych basenach.

2. Odpowiednie do namnażania biomasy wartości parametrów różnią się znacznie od optymalnych warunków do usuwania jonów metalu. Stąd proponuje się rozdzielenie węzła usuwania jonów metali od namnażania biomasy. W procesie bioakumulacji nie istnieje jednak taka możliwość, ponieważ procesy namnażania i wiązania jonów metalu zachodzą jednocześnie.
3. W procesie biosorpcji, obecność dwóch autonomicznych węzłów umożliwia dostosowanie stężenia biomasy do stężenia jonów metalu w oczyszczanych ściekach. Ze względu na znacznie większą szybkość procesu biosorpcji, w porównaniu do szybkości namnażania biomasy, rozmiary biosorbera powinny być znacznie mniejsze niż fotobioreaktora.
4. Zaproponowane rozwiązania różnią się mechanizmem oraz wydajnością. Wydajność bioakumulacji jest wyższa, przy niższej szybkości procesu. Proces bioakumulacji umożliwia usunięcie również innych zanieczyszczeń ze ścieków. Wadą procesu jest konieczność zapewnienia obecności składników odżywczych w ściekach. Jeżeli składniki te nie występują, wówczas technologia sprowadza się do procesu biosorpcji.
5. Ponieważ ścieki przemysłowe zazwyczaj nie zawierają organicznego źródła węgla, nie istnieje możliwość zastosowania tradycyjnych metod biologicznych do oczyszczania tych ścieków. Natomiast wykorzystanie szczepu posiadającego aparat fotosyntetyczny umożliwi wykorzystanie mikroorganizmów do oczyszczania ścieków przemysłowych.
6. Na podstawie przeprowadzonego procesu oczyszczania przykładowych ścieków rzeczywistych, można przypuszczać, że proponowana metoda może stać się interesującą alternatywą w stosunku to chemicznych metod tradycyjnych oczyszczania ścieków o niskim stopniu zanieczyszczenia i dużej objętości.

12. WNIOSKI

Wynikiem przeprowadzonych badań, studiów i obliczeń jest koncepcja dwóch nowych sposobów usuwania jonów metali ciężkich ze ścieków, które mogą zostać wykorzystane w praktyce. Koncepcje te można było sformułować, gdyż:

1. Wyniki badań wykazały, że **biosorpcja** opiera się na fizykochemicznych właściwościach ściany komórkowej mikroalg *Spirulina sp.* Bazuje na wysoko specyficznym i selektywnym wiązaniu jonów metali ciężkich w oparciu o udowodniony mechanizm wymiany jonowej. Na powierzchni ściany komórkowej zidentyfikowano trzy grupy funkcyjne różniące się wartością stałych dysocjacji kwasowej oraz stałych powinowactwa do poszczególnych kationów metali, co decyduje o wysokiej specyficzności wiązania. Stwierdzono, że budowa, skład i właściwości jonowymienne ściany komórkowej mikroalg *Spirulina sp.* w znacznym stopniu uzależnione są od warunków wzrostu biomasy.
2. Dowiedziono, że **bioakumulacja** łączy w sobie następujące po sobie procesy: pasywny (identyczny w mechanizmie z biosorpcją) i aktywny (akumulacja właściwa). Etap aktywny związany jest z transportem aktywnym, czyli konsumującym energię komórkową, jonów do wnętrza komórki. Zostało to uzasadnione, zmniejszeniem obserwowanych współczynników wydajności biomasy względem substratów w obecności jonów metali ciężkich.
3. Wykazano, że wykorzystywany w obydwu metodach szczep *Spirulina sp.* wykazuje właściwości adaptacji do warunków środowiskowych (głównie źródła węgla i energii) dzięki możliwości przystosowania metabolizmu do zmieniających się warunków hodowli.
4. Przeprowadzone doświadczenia nad hodowlą biomasy umożliwiły zaproponowanie modelu wzrostu w oparciu o różne źródła węgla (organiczne i nieorganiczne) oraz energii (związek organiczny i światło). Określono typowe parametry wzrostu w poszczególnych metabolizmach: **autotroficznym, heterotroficznym i miksotroficznym**. Wykazano, że miksotrofia nie jest prostą sumą autotrofii i heterotrofii
5. Stwierdzono, że proces biosorpcji można opisać równaniami procesu adsorpcji, na podstawie których wyznaczono maksymalną pojemność biosorpcyjną. Badania wykazały, że największą pojemność biosorpcyjną wykazują komórki *Spirulina sp.* hodowane w warunkach autotroficznych, następnie heterotroficznych i miksotroficznych.

6. Badania wykazały, że dobór metody oczyszczania (biosorpcji lub bioakumulacji) jest zdeterminowany składem ścieków - poziomem jonów metali ciężkich oraz zawartością innych zanieczyszczeń.
7. Wykazano, że dzięki zastosowaniu odpowiedniego eluenta biomasę związaną z jonami metalu w procesie biosorpcji można zregenerować i wykorzystać ponownie. Jeżeli jony metalu znajdują się wewnątrz komórki, wówczas istnieje możliwość spalania biomasy i uzyskania popiołu zawierającego 20-40 % usuniętego metalu, będącego potencjalnym surowcem w procesach metalurgicznych.

13. SPIS SYMBOLI I INDEKSÓW

SPIS INDEKSÓW

A	-	metabolizm autotroficzny
H	-	metabolizm heterotroficzny
M	-	metabolizm miksotroficzny
N	-	azot azotanowy
Gl	-	glukoza
Chl	-	chlorofil
X	-	biomasa
Me	-	jony metalu

SPIS SYMBOLI

$[Me^T]$	-	całkowite stężenie metalu, $[mmol/dm^3]$ (2.3.10)
$[Me^w]$	-	stężenie wewnątrzkomórkowe jonów metalu
$[Me^z]$	-	stężenie wolnych jonów metalu lub kinetycznie labilnych form nieorganicznych (2.3.1)
$[N]$	-	liczba moli transportera na jednostkę biomasy (2.3.2)
12	-	masa atomowa węgla ^{12}C we wzorze (7.1.7)
A	-	naświetlana powierzchnia reaktora, $1.92 \cdot 10^{-2} m^2$
a	-	parametr w równaniu (4.2.8)
a	-	stała adsorpcji, $[mg/dm^3]$ (2.3.8)
a,b,c	-	współczynniki proporcjonalności (6.8.1)
A_{560}	-	absorbancja mierzona przy 560 nm
A_{680}	-	absorbancja mierzona przy 560 nm
A_{sp}	-	powierzchnia adsorpcyjna komórek, $[m^2/g]$
b	-	parametr w równaniu (4.2.8)
b	-	stała związana z powinowactwem do miejsc wiążących jony metali (2.2.1, 2.2.3, 2.2.4)
C	-	stężenie, $[g/dm^3]$
C	-	stała w równaniu (2.2.5)
c	-	parametr w równaniu (4.2.8)
C_0	-	stężenie początkowe
C_{akt}	-	stężenie jonów usunięte w etapie aktywnym, $[mg/kg]$
C_{Chl-r}	-	stężenie chlorofilu w zawiesinie komórek, $[mg/dm^3]$
C_{ChlX}	-	stężenie chlorofilu w biomacie, $[mg/g \text{ s.m.}]$
C_{eq}	-	stężenie równowagowe
C_f	-	stężenie końcowe
C_{Me}	-	stężenie jonów metalu w roztworze, $[mg/kg]$
C_{pas}	-	stężenie jonów usunięte w etapie pasywnym bioakumulacji, $[mg/kg]$
D	-	szybkość rozcieńczania
E_{Gl}	-	ilość energii dostarczonej do hodowli w postaci glukozy, kJ
$E_{\text{św}}$	-	ilość energii dostarczonej do hodowli w postaci światła, [kJ]
I	-	natężenie światła, $[W/m^2]$
$I(z)$	-	natężenie światła $[W/m^2]$ w odległości z [m] od naświetlanej powierzchni
I_0	-	natężenie światła na naświetlanej powierzchni, $[W/m^2]$
I_k	-	powinowactwo mikroalg do światła $[W/m^2]$ (4.2.7-4.2.8)
I_{sr}	-	średnie natężenie światła w reaktorze, $[W/m^2]$
k	-	współczynnik wydajności bioenergetycznej, $[kJ/kJ]$
k	-	stałe szybkości reakcji I-rzędu, $[h^{-1}]$
K_i	-	stała inhibicji $[W/m^2]$ lub $[g/dm^3]$
K_M	-	stała powinowactwa wiązania metalu do miejsca wiążącego (2.3.1)
K_s	-	stała saturacji $[W/m^2]$ lub $[g/dm^3]$
L	-	całkowita droga penetracji światła w reaktorze, [m], 0.0525 m (7.1.2)
L	-	liniowa szybkość wzrostu, $[mg/dm^3 h]$ (2.3.12)
m	-	masa
m	-	eksponent w równaniu (4.2.5)
Me-N	-	stężenie kompleksu metal-nośnik, $[mmol/dm^3]$ (2.3.9)
n	-	wskaźnik intensywności sorpcji; >1 - heterogeniczność, <1 homogeniczność
N	-	stężenie nośnika, $[mmol/dm^3]$ (2.3.9)
pK_a	-	stała dysocjacji kwasowej grup funkcyjnych na powierzchni komórki

q	- pojemność biosorpcyjna - ilość jonu metalu związana przez jednostkę masy biosorbenta, [mg Me/g s.m.] lub [meq/g s.m.]
q_0	- energia 1 mola elektronów, [113 kJ/meq e-]
$q_{\max}$	- maksymalna pojemność biosorpcyjna, [mg Me/g s.m.] lub [meq/g s.m.]
q^w	- wewnątrzkomórkowe stężenie metalu, [mmol/mg] (2.3.9)
Q_X	- teoretyczna entalpia spalania biomasy, [kJ/g]
q^z	- zewnątrzkomórkowe stężenie metalu, [mmol/mg] (2.3.9)
r	- szybkość reakcji
$r_{\max}$	- maksymalna szybkość uzyskiwana przy wysyceniu miejsca transportującego (2.3.1-2)
r_X	- objętościowa szybkość wzrostu, [g/dm ³ h]
t	- czas, [h]
V	- objętość
X	- stężenie suchej masy komórek, [g/dm ³]
X_{add}	- ułamek molowy dodanego titranta
Y_{kJ}	- współczynnik wydajności bioenergetycznej, [g/kJ]
$Y_{X/S}$	- współczynnik wydajności biomasy względem substratu, [g/g]
z	- odległość od naświetlanej powierzchni, [m] (7.1.1-2)
α	- parametr w równaniu (4.2.2)
α	- współczynnik absorpcji ośrodka (zawiesiny komórek w pożywce), [m ² /g], 45.7 - wyznaczony doświadczalnie
γ_X	- stopień redukcji biomasy [równoważnik elektronów/równoważnik węgla]
ΔE	- ilość zużytej przez hodowlę energii (w postaci światła lub glukozy), [kJ]
ΔH_{Gl}	- entalpia spalania glukozy, 15.7 kJ/g
θ	- stopień pokrycia powierzchni sorbenta przez sorbat (wielkość bezwymiarowa)
μ	- specyficzna szybkość wzrostu, [h ⁻¹]
μ_m	- maksymalna w trakcie danej hodowli specyficzna szybkość wzrostu, czyli μ w fazie wzrostu logarytmicznego, [h ⁻¹]
$\mu_{\max}$	- maksymalna szybkość wzrostu, osiągana przy wysycającym natężeniu światła lub stężeniu glukozy, [h ⁻¹]
σ_X	- zawartość węgla w biomacie (ułamek molowy)

14. LITERATURA

- [1] Aggarwal D., Goyal M., Bansal R.C., *Adsorption of chromium by activated carbon from aqueous solution*, 1999, Carbon, 37, 1989-1997
- [2] Aiba, S., *Growth kinetics of photosynthetic microorganisms.*, 1982, Adv. Biochem. Eng., 23, 85-156
- [3] Aksu Z., *Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel(II) ions onto Chlorella vulgaris*, 2002, Process Biochem., 38, 89-99
- [4] Aldor I., Fourest E., Volesky B., *Desorption of cadmium from algal biosorbent*, 1995, Can. J. Chem. Eng., 73, 516-522.
- [5] Al-Saraj M., Abdel-Latif M.S., El-Nahal I., Baraka R., *Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms*, 1999, J. Non-Cryst. Solids, 248, 137-140
- [6] Altin O., Ozbelge O., Dogu T., *Use of general purpose adsorption isotherms for heavy metal - clay mineral interactions*, 1998, J. Colloid. Interf. Sci., 198, 130-140
- [7] Aoyama I., Okamura H., *Interactive toxic effect and bioconcentration between cadmium and chromium using continuous algal culture*, 1993, Envir. Toxicol. Wat. Qual. 8, 255-269
- [8] Araujo M.M., Teixeira J.A., *Trivalent Chromium Sorption on Alginate Beads*, 1997, Int. Biodeter. Biodegr., 40, 63-74
- [9] Bailey S.E., Olin T.J., Bricka R.M., Adrian D.D., *A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals*, 1999, Wat. Res., 33, 2469-2479
- [10] Bajguz A., *Blockade of heavy metals accumulation in Chlorella vulgaris cells by 24-epabrassinolide*, 2000, Plant. Physiol. Biochem., 38, 797-801
- [11] Bannister, T.T., *Quantitative description of steady state, nutrient-saturated algal growth, including adaptation.*, 1979, Limnol. Oceanogr., 24, 79-96
- [12] Barron M.G., *Bioaccumulation and Bioconcentration in Aquatic Organisms*, str. 652-666 w: Hoffman D.J., Rattner B.A., Burton Jr. G.A., Cairns Jr. B.G., *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press Inc., Boca Raton USA, 1995
- [13] Becker E.W., *Microalgae. Biotechnology and Microbiology.*, 1994, Cambridge University Press, Cambridge, 13
- [14] Black W.A., Mitchell R.L., *Trace elements in the common brown algae and in sea water.*, 1952, J. Mar. Biol. Assoc., 30, 575-584
- [15] Blanch H.W., Clark D.S., *Biochemical Engineering*, 1996, Marcel Dekker, New York str. 195
- [16] Borowitzka M.A., B Borowitzka L.J., *Micro-Algal Biotechnology*, Cambridge University Press 1988, 85.
- [17] Borowitzka, M.A., *Closed algal photobioreactors: design considerations for large-scale systems*, 1996, J. Mar. Biotechnol., 4, 185-191
- [18] Brambeer C., *Bigger Profits through improved wastewater treatments*, 1987, Finishers manage., 32, 36
- [19] Brooks C. S., *Metal Recovery from Industrial Waste*. Lewis Publishers, Inc., Michigan, USA, 1991, pp. 27-112
- [20] Canizares-Villaneuva R.O., Dominguez A.R., Cruz M.S., Rios-Leal E., *Chemical Composition of cyanobacteria grown in diluted, aerated swine wastewater*, 1995, Biores. Technol., 51, 111-116
- [21] Carlozzi P., Torzillo G., *Productivity of Spirulina in a strongly curved outdoor tubular photobioreactor*, 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol., 45, 18-23
- [22] Cezikova J., Kozler J., Madronova L., Novak J., Janos P., *Humic acids from coals of the North-Bohemian coal field II. Metal-Binding capacity under static conditions*, 2001, React. Funct. Polym., 47, 111-118
- [23] Chanda M., Rempel G.L., *Chromium(III) removal by poly(ethyleneimine) granular sorbents made by a new process of templated gel filling*, 1997, React. Funct. Polym., 35, 197-207
- [24] Chauhan V.S., Gurbaksh S., Ramamurthy V., *Eucalyptus Kraft Black Liquor Enhances Growth and Productivity of Spirulina in Outdoor Cultures*, 1995, Biotechnol. Prog., 11, 457-460
- [25] Chen F., *High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth*, 1996, Tibtech, 1996, 14, 421-426
- [26] Chen F., Johns M.R.A., *A strategy for high cell density culture of heterotrophic microalgae with inhibitory substrates*, 1992, J. Appl. Phycol., 7, 43-46
- [27] Chen F., Zhang Y., Guo S., *Growth and phycocyanin formation of Spirulina platensis in photoheterotrophic culture*, 1996, Biotechnol. Lett., 18, 603-608
- [28] Chen F., Zhang Y., *High cell density mixotrophic culture of Spirulina platensis on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system*, 1997, Enzyme Microb. Technol., 20, 221-224
- [29] Cheung C.W., Porter J.F., McKay G., *Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char*, 2001, Wat. Res., 35(3), 605-612
- [30] Chojnacka K., Noworyta A., *Biosorpcja metali ciężkich przez niebieskozielone algi Spirulina*, I Sympozjum Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska, O.W.PWr, Wrocław 2001, 71-76
- [31] Chojnacka K., Noworyta A., *Chromium and phosphorus removal by blue-green algae Spirulina*, 2001, Pol. J. Chem. Tech., 2, 4-7
- [32] Chojnacka K., Noworyta A., *Experimental study of the biosorption sites in Spirulina sp.*, Bioresource Technology (w druku)

- [33] Chojnacka K., Noworyta A., *Hodowla Spirulina sp. w fotobioreaktorze*, II Sympozjum Centrum Biomonitoringu, Biotechnologii i Ochrony Ekosystemów Dolnego Śląska (w druku)
- [34] Chojnacka K., Noworyta A., *Mechanizm biosorpcji jonów metali ciężkich przez niebieskozielone algi Spirulina sp.*, 2001, Inż. Chem. Proces., 22, 3B, 331-336
- [35] Chojnacka K., Noworyta A., *Nitrate removal by Spirulina sp. in aerated stirred tank photobioreactor*, in: Chemical products in agriculture and environment, pod redakcją: H. Górecki, Z. Dobrzański, Czech-Pol Trade, Prague - Brussels - Stockholm, Czechy, 2002, 416-422
- [36] Chojnacka K., Noworyta A., *Spirulina - fotosyntezująca bakteria, zdolna do usuwania metali ciężkich*, Chemik, 2001, 4, 87-93
- [37] Chojnacka K., Noworyta A., *Studies on biosorption properties of heavy metal ions by a blue-green algae Spirulina sp.*, in: Pollution Control in Agriculture and Fertilizer Industry, Chemistry for Agriculture - Vol. 2, pod redakcją Górecki H., Zwoździak J., Czech-Pol Trade, Prague-Brussels-Stockholm, Czechy, 2001, 154-163.
- [38] Chojnacka K., Noworyta A., *Using microfiltration to assist in processes of biosorption and bioaccumulation of heavy metal ions by microalgae*, w: "Using membranes to assist in cleaner processes", 2001, Argi, Wrocław, 201-206
- [39] Chojnacka K., Noworyta A., *Zastosowanie mikroalg Spirulina sp. do oczyszczania ścieków przemysłowych zawierających metale ciężkie*, Prace Nauk. Inż. Chem. i Proces. Politechniki Warszawskiej, 2000, 26, 2, 101-110
- [40] Chojnacka-Górecka K., *Zastosowanie mikroalg Spirulina do oczyszczania ścieków*, Praca Magisterska, Wrocław 1999
- [41] Chong A.M.Y., Wong Y.S., Tam N.F.Y., *Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater*, 2000, Chemosphere, 41, 251-257
- [42] Chong K.H., Volesky B., *Metal biosorption equilibria in a ternary system*, 1996, Biotechnol. Bioeng. 49, 629-638.
- [43] Chong K.-H., Volesky B., *Description of 2-metal biosorption equilibria by Langmuir-type models*, 1995, Biotechnol. Bioeng. 47, 451-460.
- [44] Chronakis I.S., *Gelation of Edible Blue-Green Algae Protein Isolate (Spirulina platensis Strain Pacifica): Thermal Transitions, Rheological Properties, and Molecular Forces Involved*, 2001, J.Agric.Food.Chem., 49, 888-898
- [45] Chu, K.H., Hashim, M.A., Phang, S.M., Samuel, V.B., *Biosorption of cadmium by algal biomass: adsorption and desorption characteristics*, 1997, Wat. Sci. Tech. 35, 115-122
- [46] Cogne G., Lasseur Ch., Cornet J.F., Dussap C.G., Gros J.B., *Growth monitoring of a photosynthetic micro-organism (Spirulina platensis) by pressure measurement*, 2001, Biotechnol. Lett., 23, 1309-1314
- [47] Cohen B., Petrie J.G., *Containment of chromium and zinc in ferrochromium flue dusts by cement-based solidification*, 1997, Can. Metall. Quart., 36(4), 251-260
- [48] Cohen E., Koren A., Arad S., *A closed system for outdoor cultivation of microalgae*, 1991, Biomass. Bioenerg., 1(2), 83-88
- [49] Corder S., Reeves M., *Biosorption of Nickel in Complex Aqueous Waste Streams by Cyanobacteria*, 1994, Appl. Biochem. and Biotechnol., 45/46, 847-859
- [50] Cornet J.F., Dussap C.G., Gros J.B., *A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactor*, 1995, Chem. Eng. Sci., 50(9), 1489-1500
- [51] Cosson, Richard P.; Vivier, Jean-Paul, *Impact of Metals on Hydrothermal Vent Communities: Bioaccumulation and Detoxification Processes*, 1995, Mar. Environ. Res., 39, 1-4, 349
- [52] Crist, D.R., Crist, R.H., Martin, J.R., Watson, J.R., *Ion exchange systems in proton-metal reaction with algal cell walls*, 1994, FEMS Microbiol. Rev. 14, 309-314
- [53] Critchley C., *Studies on the mechanisms of photoinhibition in higher plants*, 1981, Plant. Physiol., 67, 1161-1165
- [54] Csoban K., Joo P., *Sorption of Cr(III) on silica and aluminium oxide: experiments and modelling*, 1999, Colloid Surface A, 151, 97-112
- [55] Csoban K., Parkanyi-Berka M., Joo P., Behra P.J., *Sorption experiments of Cr(III) onto silica*, 1998, Colloid Surface A, 141, 347-364
- [56] Dąbrowski A., *Adsorption-from theory to practice*, 2001, Advances in Colloid and Interface Science, 93, 135-224
- [57] Danny C.K., Porter J.F., McKay G., *Optimised correlations for the fixed-bed adsorption of metal ions on bone char*, 2000, Chem. Eng. Sci., 55, 5819-5829
- [58] Darnall D.W., Hosea J.M., *SITE-Emerging Technologies: Removal and Recovery of Metal Ions from Groundwater*, EPA/540/5-90/005a
- [59] Darnall, D. W. and B. Greene, M. T. Henzi, J. M. Hosea, R. A. McPherson, J. Snedson, and M. D. Alexander, *Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass*, 1986, Environ. Sci. Technol., 20, 206-208.
- [60] Daughney, C.J., Fein, J.B., Nathan Y., *A comparison of the thermodynamics of metal adsorption onto two common bacteria*, 1998, Chemical Geology 144, 161-176
- [61] Davis C.M., Vincent J.B., *Chromium oligopeptide activates insulin receptor tyrosine kinase activity*, 1997a, Biochemistry, 36, 4382-4385

- [62] Davis T.A., Volesky B., Vieira, R.H.S.F., *Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metals*, 2000, Wat.Res. 34, 4270-4278.
- [63] De Pauw N., Morales J., Persoone G., *Mass Culture of microalgae in aquaculture systems: progress and constraints*, 1984, Hydrobiologia, 116/117, 121-134
- [64] deCarvalho R.P., Chong K.H., Volesky B., *Effects of leached alginate on metal biosorption*, 1994, Biotech. Lett. 46, 875-80.
- [65] deCarvalho R.P., Chong K.H., Volesky B., *Evaluation of the Cd, Cu and Zn biosorption in two-metal systems using algal biosorbent*, 1995, Biotechnol. Progress, 11, 39-44
- [66] Deng, X.; Wilson, D. B. *Bioaccumulation of mercury from wastewater by genetically engineered Escherichia coli*, 2001, Appl. Microbiol. Biot., 56, - 1- 2, 276 - 279
- [67] Devars S., Hernandez R., Moreno-Sanchez R., *Enhanced Heavy Metal Tolerance in Two Strains of Photosynthetic Euglena gracilis by Preexposure to Mercury or Cadmium*, 1998, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 34, 128-135
- [68] Dodge J.D., *The Fine Structure of Algal Cells*, Academic Press, New York, 1973, 14, 188
- [69] Donmez G., Aksu Z., *Bioaccumulation of copper (II) and nickel (II) by the non-adapted and adapted growing Candida sp.*, 2001, Wat. Res., 35(6), 1425-1434
- [70] Donmez G., Aksu Z., Ozturk A., Kutsal T., *A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae*, 1999, Process. Biochem., 34, 885-892
- [71] Doran P.M., *Bioprocess Engineering Principles*, Academic Press Ltd. , San Diego, 1995
- [72] Duerr E.O., Edralin M.R., Price N.M., *Facilities requirements and procedures for the laboratory and outdoor raceway culture of Spirulina spp.*, 1997, J. Mar. Biotechnol., 5, 1-11
- [73] Duffus J.H., "Heavy Metals" - *A Meaningless Term*, Chemistry International, 2001, 23(6), 163-167
- [74] Ehrlich H.L., Brierley C.L., *Microbial Mineral Recovery*, McGraw-Hill Book Co, New York, N.Y. 1990
- [75] Ehrlich H.L., *Microbes and metals*, 1997, Appl. Microbiol. Biotechnol., 48, 687-692
- [76] Ehrlich H.L., *What types of microorganisms are effective in bioleaching, bioaccumulation of metals, ore beneficiation and desulfurization of fossil fuels?*, 1986, Biotechnol. Bioeng., 16, 227-237
- [77] Emerson R., Green L., *Effect of hydrogen-ion concentration on Chlorella photosynthesis*, 1938, Plant Physiol., 13, 157-161
- [78] Federal Register Environmental Protection Agency, Part II 40 CFR Part 437, *Effluent Limitations Guidelines, Pretreatment Standards, and New Source Performance Standards for the Centralised Waste Treatment Point Source Category; Proposed Rule*, 1999, Vol. 64 No. 8
- [79] Fein J.B., Daughney C.J., Yee N., Davis T.A., *A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces*, 1997, Geochim. Cosmochim. Ac., 61(16), 3319-3328
- [80] Ferraz A.I., Teixeira J.A., *The use of flocculating brewer's yeast for Cr(III) and Pb(II) removal from residual wastewaters*, 1999, Bioprocess Eng., 21, 431-437
- [81] Figueira M.M., Volesky B., Azarian K., Ciminelli V.S.T., *Biosorption column performance with a metal mixture*, 2000, Environ. Sci. Technol. 34(20); 4320-4326.
- [82] Figueira M.M., Volesky B., Ciminelli V.S.T., *Assessment of interference in biosorption of heavy metals*, 1997, Biotechnol. Bioeng. 54, 344-349.
- [83] Figueira M.M., Volesky B., Mathieu H.J., *Instrumental analysis study of iron species biosorption by Sargassum biomass*, 1999, Environ. Sci. Technol. 33 (11), 1840-1846.
- [84] Fiore M.F., Moon D.H., Trevors J.T., *Metal Resistance and Accumulation in Cyanobacteria*, w: Wong Y.-S., Tam N.F.Y. (Eds.), *Wastewater Treatment with Algae*, 1998, Springer-Verlag, Berlin, str. 111-124
- [85] Fourest E., Volesky B. , *Contribution of sulphonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of Sargassum fluitans*, 1996, Environ. Sci. Technol. 30, 277-282
- [86] Fourest E., Volesky B., *Alginate properties and heavy metal biosorption by seaweed biomass.*, 1997, Appl. Biochem. Biotechnol. 67, 215-226.
- [87] Frima F.M., Sevilla J.M.F., Perez J.A.S., Camacho F.G., *A study of simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances*, 1996, J. Biotechnol., 45, 59-69
- [88] Gadd G. M., Griffiths A.J., *Microorganisms and Heavy Metal Toxicity*, 1978, Microbial. Ecol., 4, 303-317
- [89] Gadd G. M., *Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms*, 1991, Experientia, 46, 834-840
- [90] Gadd G. M., White C., *Removal of thorium from simulated acid process stream by fungal biomass: potential for thorium desorption and reuse of biomass and desorbent*, 1992, J. Chem. Technol. Biotechnol., 55, 39-44
- [91] Gadd G. M., White Ch., *Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology?*, 1993, Tibtech, 11, 353-359
- [92] Gin K., Tang Y.Z., Aziz M.A., *Heavy Metal Uptake by Algae*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*", 2001, Springer, Berlin, str. 137-169
- [93] Gordon A.S., Howell L.D., Harwood V., *Response of diverse heterotrophic bacteria to elevated copper concentrations*, 1994, Can. J. Microbiol., 40, 408-411
- [94] Gorib G., Corradi M.G., Invidia M., Bassi M., *Light Intensity Influences Chromium Bioaccumulation and Toxicity in Scenedesmus acutus (Chlorophyceae)*, 2001, Ecotox. Environ. Safe., 48, 36-42
- [95] Greer D.H., Berry J.A., Bjorkman O., *Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves. Role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery*, 1986, Planta, 168, 253-258

- [96] Grima E.M., Camach F.G., Perez J.A., Fernandez F.G., Sevilla J.M., *Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance*, 1997, *Enzyme. Microb. Tech.*, 21, 375-381
- [97] Grima, E.M., *A mathematical model of microalgal growth in light limited chemostat cultures.*, 1996, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 45, 59-69
- [98] Grima, E.M., Fernandez, F.G., Camacho, F.G., Chisti, Y., *Photobioreactors: light regime, mass transfer and scaleup*, 1999, *J. of Biotechnol.*, 70, 231-247
- [99] Gupta P., Suidan M.T., Sayles G.D., *Modeling Kinetics of Chloroform Cometabolism in Methanogenic and Sulfate-Reducing Environments*, 1996, *Wat. Sci. Tech.*, 34, 403-410
- [100] Hadjispyrou, S.; Kungolos, A.; Anagnostopoulos, A., *Toxicity, Bioaccumulation, and Interactive Effects of Organotin, Cadmium, and Chromium on Artemia franciscana*, 2001, *Ecotox. Environ. Safe.*, 49, 2, 179-186
- [101] Hall D.O., Long S.P., *Introduction. Photosynthesis and the Changing environment*, w: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (Eds.), *Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A field laboratory manual.*, 1993, Chapman&Hall, London str. xxii-xxvii
- [102] Harden V.P., Harris J.O., *The isoelectric point of bacterial cells*, *J.Bacteriol.* 1953, 65, 198-202
- [103] Hirata S., Hata J.I., Taya M., Tone S., *Evaluation of Spirulina platensis growth considering light intensity distribution in photoautotrophic batch culture*, 1997, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 30(2), 355-359
- [104] Hirata S., Taya M., Tone S., *Continuous cultures of Spirulina platensis under photoautotrophic conditions with change in light intensity*, 1998, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 31(4), 636-639
- [105] Holan Z.R., Volesky B., *Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents*, 1995, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 53, 133-146.
- [106] Holan Z.R., Volesky B., *Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae*, 1994, *Biotech Bioeng.* 43, 1001-9
- [107] Holan Z.R., Volesky B., Prasetyo I., *Biosorption of Cd by biomass of marine algae*, 1993, *Biotech. Bioeng.* 41, 819-25.
- [108] Hulanicki A., *Reakcje kwasów i zasad w chemii analitycznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992
- [109] Ignatevskaya M.A., Thukral A.K., Burdin K.S., Nosov V.N., *Morphological and physiological characteristics of Spirulina platensis under conditions of photoautotrophic and mixotrophic growth in the light and dark*, 1996, *Microbiologiya*, 65, 613-620
- [110] Internet www.onet.pl "Wiem" Encyklopedia Multimedialna
- [111] Internet www.star-scream.ocean.washington.edu/oce539stuff/lect5-3.html
- [112] Inthorn D., *Removal of Heavy Metal by Using Microalgae*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 111-137
- [113] Jankowska H., Świątkowski A., Choma J., *Węgiel aktywny*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1985
- [114] Janssen M., Bresser L., Baijens T., Tramper J., *Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles*, 2000, *J. Appl. Phycol.*, 12, 225-237
- [115] Janssen, M., Slenders P., Tramper J., Mur L. R., Wijffels R., *Photosynthetic efficiency of Dunaliella tertiolecta under short light/dark cycles*, 2001, *Enzyme Microb. Tech.*, 29, 298-305
- [116] Jassem W.(Ed.), *Wielki Słownik Angielsko-Polski, Polsko-Angielski*, Wiedza Powszechna, Warszawa 1986.
- [117] Jura Cz., Krzanowska H., *Leksykon Biologiczny*, Wiedza Powszechna, Warszawa 1992, str. 18, 224
- [118] Kaixian Q., Wendong H., Yuehan Y., Beiluo P., *The Studies About Some Characteristics of Spirulina subsalsa var. from Laboratory to Outdoors*, 1995, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 53, 91-98
- [119] Kaplan A., *Photoinhibition of Spirulina platensis: response of photosynthesis and HCO₃⁻ uptake capability to CO₂- depleted conditions*, 1981, *J. Exper. Bot.*, 32, 669-674
- [120] Kaplan D., Richmond A.E., Dubinsky Z., Aaronson S., *Algal Nutrition*, w: Richmond, A. (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, 1986, CRC Press, Boca Raton, FL
- [121] Kapoor, A. Viraraghavan, T., *Heavy metal biosorption sites in Aspergillus niger*, 1997, *Biores. Technol.* 61, 221-227
- [122] Karapetyan N.V., Shubin V.V., Strasser R.J., *Energy exchange between the chlorophyll antennae of monomeric subunits within the Photosystem I trimeric complex of the cyanobacterium Spirulina*, 1999, *Photosynth. Res.*, 61, 291-301
- [123] Karuna-Karan A., *A case for farming microalgae*, 1988, *ASM News*, 54, 167-172
- [124] Khoshmanesh A., *Cadmium uptake by unicellular green microalgae*, 1997, *Chem. Eng. J.*, 65, 13-19
- [125] Khoshmanesh A., Lawson F. and Prince I.G., *Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular green micro-algae*, 1997, *Chemical Eng. J. (British Journal)*, 65, 13-19
- [126] Khoshmanesh A., Lawson F., Prince I.G., *Cadmium uptake by unicellular green microalgae*, 1996, *Chem. Eng. J.*, 62, 81-88
- [127] Khoshmanesh A., Ting Y.P. and Lawson F., *A Review on the Mathematical Modelling of the uptake of heavy metals by micro-organisms*, 1999, *The Chemical Engineering Journal (British Journal)*, 70, 35-41
- [128] Khummongkol D., Canterford G.S., Fryer C., *Accumulation of Heavy Metals in Unicellular Algae*, 1982, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2643-2660
- [129] Klimov V.V., Baranov S.V., Allakhverdiev, *Bicarbonate protects the donor side of photosystem II against photoinhibition and thermoinactivation*, 1997, *FEBS Letters*, 418, 243-246

- [130] Klimov V.V., Baranov S.V., *Bicarbonate requirement for the water-oxidizing complex of photosystem II*, 2001, Biochim. Biophys. Acta, 1503, 187-196
- [131] Kojima H., Kawata Y., *A Mini-Transposon/Transposase Complex as a New Tool for the Genetic Transformation of Microalgae*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 217-225
- [132] Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 195-200
- [133] Koning R. E., *Cyanophyta*, 1994, Plant Physiology Website, http://koning.ecsu.ctstateu.edu/plant_biology/cyanophyta.html
- [134] Kratochvil D., Fourest E., Volesky B., *Biosorption of copper by Sargassum fluitans biomass in a fixed-bed column*, 1995, Biotechnol. Lett. 17, 777-782.
- [135] Kratochvil D., Pimentel P., Volesky B., *Removal of trivalent and hexavalent chromium by seaweed biosorbent*, 1998, Environ. Sci. Technol. 32, 2693-2698.
- [136] Kratochvil D., Volesky B., *Advances in the biosorption of heavy metals*, 1998, Trends Biotechnol. 16, 291-300.
- [137] Kratochvil D., Volesky B., *Biosorption of Cu from ferruginous wastewater by algal biomass*, 1998, Wat. Res. 32, 2760-2768.
- [138] Kratochvil D., Volesky B., *Multicomponent biosorption in fixed beds*, 2000, Wat. Res., 34, 3186-3196.
- [139] Kratochvil D., Volesky B., *Optimizing Cu removal/recovery in a biosorption column*, 1997, Water Res. 31, 2327-39.
- [140] Kuyucak N., Volesky B., *Desorption of cobalt-laden algal biosorbent*, 1989, Biotechnol. Bioeng. 33(7), 815-22.
- [141] Kuyucak N., Volesky B., *The mechanism of cobalt biosorption*, 1989, Biotechnol. Bioeng. 33(7), 823-31.
- [142] Kuyucak N., Volesky B., *Accumulation of cobalt by marine alga*, 1989, Biotechnol. Bioeng. 33(7), 809-14.
- [143] Kuyucak N., Volesky B., *Biosorbents for recovery of metals from industrial solutions*, 1988, Biotechnol. Lett. 10, 137-42.
- [144] Laliberte G., Olguin E., Noue J., *Mass Cultivation and Wastewater Treatment Using Spirulina*, w: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, cell biology and biotechnology*, 1997, Taylor & Francis, New York, str. 159-173
- [145] Lamela T., Marquez F.J., *Phycocyanin production in seawater culture of Arthrospira maxima*, 2000, Ciencias Marinas, 26(4), 607-619
- [146] Largeau C., Metzger P., *Hydrocarbons and High Molecular Weight Lipids of the Green Microalga Botryococcus braunii*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, 257-289
- [147] Leborans G.F., Novillo A., *Toxicity and bioaccumulation of cadmium in Olisthodiscus luteus (Raphidophyceae)*, 1996, Wat. Res., 30(1), 52-62
- [148] Lee C.K., Low K.S., Kek K.L., *Removal of Chromium from Aqueous Solution*, 1995, Biosource Technol., 54, 183-189
- [149] Lee H.S., Volesky B., *Evaluation of aluminum and copper biosorption in a two-metal system using algal biosorbent*, 1999, Environ. Sci. 2 (2), 149-158.
- [150] Lee H.S., Volesky B., *Characteristics of aluminum biosorption by Sargassum fluitans biomass*, 1999, Mar. Biotechnol. 1, 380-383.
- [151] Lee H.S., Volesky B., *Interaction of light metals and protons with seaweed biosorbent*, 1997, Water Res. 31, 3082-88.
- [152] Lee H.S., Volesky B., *Interference of aluminium in copper biosorption by an algal biosorbent*. Water 1999, Qual. Res. J. Canada, 34(3), 519-533.
- [153] Lee R.E., *Phycology (Basic Characteristics of the Algae)*, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1980, 27
- [154] Lee Y.K., *Enclosed bioreactors for the mass cultivation of photosynthetic microorganisms: the future trend*, 1992, Trends. Biotechnol., 4, 186-189
- [155] Lee, H.Y., Erickson, L.E., Yang, S.S. *Kinetics and Bioenergetics of Light-Limited Photoautotrophic Growth of Spirulina platensis*, 1987, Biotechnol. Bioeng., 29, 832-843
- [156] Lee, H.Y., Erickson, L.E., Yang, S.S. *The Estimation of Growth Yield and maintenance Parameters for Photoautotrophic Growth of Spirulina platensis*, 1984, Biotechnol. Bioeng., 26, 926-935
- [157] Leusch A., Holan Z.R., Volesky B., *Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically reinforced biomass of marine algae*, 1995, J. Chem. Technol. Biotechnol. 62, 279-288.
- [158] Leusch A., Holan Z.R., Volesky B., *Solution and particle effects on the biosorption of heavy metals by seaweed biomass*, 1996, Appl. Biochem. Biotechnol. 61(3), 231-249.
- [159] Leusch A., Volesky B., *The influence of film diffusion on cadmium biosorption by marine biomass*, 1995, J. Biotechnol. 43, 1-10.
- [160] Levert J.M., Xia J., *Modeling the growth curve for Spirulina (Arthrospira) maxima, a versatile microalga for producing uniformly labelled compounds with stable isotopes*, 2001, J. Appl. Phycol., 13, 359-367
- [161] Leyva-Ramos R., Ruentes-Rubio L., Guerrero-Coronado R.M., Mendoza-Barron J., *Adsorption of Trivalent Chromium from Aqueous Solutions onto Activated Carbon*, 1995, J. Chem. Tech. Biotechnol., 62, 64-67
- [162] Liehr S.K., *Metals removal by algal biofilms*, 1994, Water Sci. Tech., 30(11), 59-68

- [163] Lim T.H., Lo C.S., Lee Y.K., *The Potential of Applying Algae in Oily Wastewater Treatment*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 169-185
- [164] Lin L.P., Chen T., *Factors affecting the mixotrophic growth of Chlorella pyrenoidosa*, 1994, J. Chin. Chem. Soc.-Tajp., 32(1), 91-102
- [165] Lips S.H., Avissar Y.J., *Photosynthesis and Ultrastructure in Microalgae*, w: Richmond, A. (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, 1986, CRC Press, Boca Raton, FL, str. 43-68
- [166] Liu Y.D., Song L.R., Shen Y.W., Li D.H., Hu C.X., Huang Z.B., Hu Z.L., Zhu Y.Z., *Potential of Terrestrial Microalgae and Cyanobacteria in Environmental Technology*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 195-217
- [167] Lobban C.S., Harrison P.J., *Seaweed Ecology and Physiology*, Cambridge University press, 1994, Cambridge, United Kingdom
- [168] Lodi A., Solisio C., Converti A., del Borghi M., *Cadmium, zinc, copper, silver and chromium (III) removal from wastewaters by Sphaerotilus natans*, 1998, Bioprocess Eng., 19, 197-203
- [169] Lovley D., *Environmental Microbe-Metal Interactions*, ASM Press Washington D.C., Washington 2000, 329-350
- [170] Lu C., Vonshak A., *Photoinhibition in outdoor Spirulina platensis cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients*, J. Appl. Phycol. 11:355-359, 1999
- [171] Lu C.M., Chau C.W., Zhang J.H., *Acute toxicity of excess mercury on the photosynthetic performance of cyanobacterium S. platensis - assessment by chlorophyll fluorescence analysis*, 2000, Chemosphere, 41, 191-196
- [172] Macaskie L.E., Dean A.C., Cheetham R.J., *Cadmium accumulation by Citrobacter sp.: the chemical nature of the accumulated metal precipitate and its location on the bacterial cells*, 1992, J.Gen. Microbiol., 133, 539
- [173] Madrid Y., Barrio-Cordoba M., Camara C., *Biosorption of antimony and chromium species by Spirulina platensis and Phaseolus. Applications to bioextract antimony and chromium from natural and industrial wastewaters*, 1998, Analyst, 123, 1593-1598
- [174] Madrid Y., Cabrera C., Perez-Corona T., Camara C., *Speciation of methyl mercury and Hg(II) using bakers yeast biomass (Saccharomyces cerevisiae) determination by continuous flow mercury cold vapor generation atomic absorption spectrometry*, 1995, Anal. Chem., 67, 750-754
- [175] Maeda Sh., Ohki A., *Bioaccumulation and Biotransformation of Arsenic, Antimony and Bismuth Compounds by Freshwater Algae*, w: Wong Y.-S., Tam N.F.Y. (Eds.), *Wastewater Treatment with Algae*, 1998, Springer-Verlag, Berlin, str. 73-92
- [176] Mahan C., Holcombe., *Immobilization of algae cells on silica gel and their characterization for trace metal preconcentration*, 1992, Anal. Chem., 64, 1993-1939
- [177] Mameri N., Boudries N., Addour L., *Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving Streptomyces rimosus biomass*, 1999, Wat. Res., 33(6), 1347-1354
- [178] Maquieira A., Elmahadi H., Puchades R., *Technique and support for microorganism immobilization. Application to trace metals enrichment by flow injection atomic absorption spectrometry*, 1996, Analyst, 121, 1633-1635
- [179] Marquez F.J., Nishio N., Nagai S., Sasaki K., *Enhancement of biomass and pigment production during growth of Spirulina platensis in mixotrophic culture*, 1995, J.Chem.Tech.Biotech., 62, 159-164
- [180] Marquez F.J., *Reassessment of the bioenergetic yield of Arthrospira platensis using continuous culture*, 1999, World J. Microbiol. Biotechnol., 15, 209-211
- [181] Marquez F.J., Sasaki K., Kakizono t., Nishio N., Nagai S., *Growth characteristics of Spirulina platensis in mixotrophic and heterotrophic conditions*, 1993, J.Ferment.Bioeng., 76, 408-410
- [182] Marquez F.J., Sasaki K., Nishio N., Nagai S., *Inhibitory effect of oxygen accumulation on the growth of Spirulina platensis*, 1995, Biotechnol. Lett., 17, 225-228
- [183] Martinez M.A., Camacho F., Jimenez J.M., Espinola J.B., *Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of Chlorella pyrenoidosa mixotrophic growth*, 1997, Proces Biochem., 32(2), 93-98
- [184] Miller G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, 1959, Anal. Chem., 31, 426-428
- [185] Miskiewicz, E., Ivanov A.G., Williams J.P., Khan M.U., Falk S., Hüner N.P.A., *Photosynthetic acclimation of the filamentous cyanobacterium, Plectonema boryanum UTEX 485, to temperature and light*, 2000, Plant Cell Physiol., 41 (6), 767-775.
- [186] Mohanty P., Srivastava M., Krishna K.B., *The Photosynthetic Apparatus of Spirulina: Electron Transport and Energy Transfer*, w: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, cell biology and biotechnology*, 1997, Taylor & Francis, New York, str. 17-42
- [187] Monod J., *The growth of bacterial cultures*, 1949, Ann. Rev. Microbiol., 3, 371-395
- [188] Morist A., Montesinos J.L., Cusido J.A., Godia F., *Recovery and treatment of Spirulina platensis cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food*, 2001, Process Biochem., 37, 535-547
- [189] Morita M., Watanabe Y., Saiki H., *Investigation of Photobioreactor Design for Enhancing the Photosynthetic Productivity of Microalgae*, 2000, Biotechnol. Bioeng., 69, 369-697

- [190] Muranaka T., Marakami M., *CO₂ fixation by a High Temperature High CO₂ Tolerant Chlorella sp.*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 77-111
- [191] Neidhart S., Herwald S., Lippmann Ch., *Biosampling of metal speciation*, 1990, J. Anal. Chem., 337, 853-859
- [192] Neilson A. H., Blankley W.F., Lewin R.A., *Growth with organic carbon and energy sources*, w: Stein J.R.D. (ED.), *Handbook of Phycological Methods*, 1973, Cambridge University Press, Cambridge, str. 275-285
- [193] Nichols P.B., Couch J.D., Al-Hamdani S.H., *Selected physiological responses of Salvinia minimato different chromium concentrations*, 2000, Aquat. Bot., 68, 313-319
- [194] Nies D.H., *Microbial heavy-metal resistance*, 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 730-750
- [195] Niu H., Volesky B., *Characteristics of gold biosorption from cyanide solution*, 1999, J.Chem. Technol.Biotechnol. 74, 778-784.
- [196] Niu H., Volesky B., *Gold-cyanide biosorption with L-cysteine*, 2000, J.Chem.Technol.Biotechnol. 75, 436-42.
- [197] Niu H., Xu X.S., Wang J.H., Volesky B., *Removal of lead from aqueous solutions by Penicillium biomass*, 1993, Biotechnol. Bioeng. 42, 785-787
- [198] *Nowa Encyklopedia Powszechna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1997
- [199] Ogawa T., Terui G., *Studies on the growth Spirulina platensis (I) On the pure culture of Spirulina platensis*, 1970, J. Ferment. Technol., 48, 361-365
- [200] Ogbonna J.C., Tanaka H., *Light requirement and photosynthetic cell cultivation - Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors*, 2000, J. Appl. Phycol., 12, 207-218
- [201] Ogbonna J.C., Yada H., Tanaka H., *Kinetic Study on Light-Limited Batch Cultivation of Photosynthetic Cells*, 1995, J. Ferment. Bioeng., 80(3), 259-264
- [202] Olguin E.J., Galicia S., Angulo-Guerrero O., Hernandez E., *The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of Spirulina sp. (Arthrospira) grown on digested pig waste*, 2001, Bioresource Technol., 77, 19-24
- [203] Olguin E.J., Galicia S., Camacho R., Mercado G., Perez T.J., *Production of Spirulina sp. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperature climatic conditions*, 1997, Appl. Microbiol. Biotechnol., 48, 242-247
- [204] Ono T., Noguchi T., Nakajima Y., *Characteristic changes of function and structure of Photosystem II during strong-light photoinhibition under aerobic conditions*, 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1229, 239-248
- [205] Osmond B., Badger M., Maxwell K., Bjorkman O., Leegood R., *Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation*, 1997, Trends Plant Sci., 2(4), 119-121
- [206] Oswald W., Gootas H.B., *Photosynthesis in sewage treatment*, 1957, Trans. Am. Soc. Civ. Eng., 122, 73-105
- [207] Oswald W.J., *Microalgae and waste-water treatment*, w: Borowitzka M.A., Borowitzka L.J.(Eds.), *Micro-Algal Biotechnology*, 1988, Cambridge University Press, Cambridge, str. 305-328
- [208] Paderewski M.L., *Procesy adsorpcyjne w inżynierii chemicznej*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1999
- [209] Pempkowiak J., Kosakowska A., *Accumulation of cadmium by green algae Chlorella vulgaris in the presence of marine humic substances*, 1998, Environ. Int., 24(5/6), 583-588
- [210] Perez-Corona T., Madrid Y., Camara C., *Evaluation of selective uptake of selenium (Se(IV) and Se(VI)) and antimony (Sb(III) and Sb(V)) species by baker's yeast cells (Saccharomyces cerevisiae)*, 1997, Anal. Chim. Acta, 345, 249-255
- [211] Phang S.M., Chui Y.Y., Kumaran G., Jeyaratnam S., Hashim M.A., *High Rate Algal Ponds for Treatment of Wastewater - A Case Study for the Rubber Industry*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 51-77
- [212] Pirt S.J., *Maximum photosynthetic efficiency: A problem to be resolved*, 1983, Biotech. Bioeng., 25, 1915-1922
- [213] Powles B.S., *Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light*, 1984, Annu.Rev. Plant. Physiol., 35, 15
- [214] Pradhan A.A., Levine A.D., *Microbial biosorption of copper and lead from aqueous systems*, 1995, Sci. Total Environ., 170, 209-220
- [215] Prince I.G., Ting Y.P., Lawson F., *Modeling the Uptake of Metal Ions by Living Algal Cells*, w: Wong Y.-S., Tam N.F.Y. (Eds.), *Wastewater Treatment with Algae*, 1998, Springer-Verlag, Berlin, str. 125-144
- [216] Pulz O., *Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms*, 2001, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 287-293
- [217] Radwan S.S., Al-Hasan R.H., Radwan S.S., Al-Hasan R.H., *Cyanobacteria and the Self-Cleaning of Oily Environments*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 181-195
- [218] Ragan H.A., Mast T.J., *Cadmium inhalation and male reproductive toxicity*, 1997, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 1114, 1-22
- [219] Rajagopal S., Murthy S.D.S., Mohanty P., *Effect of ultraviolet-B radiation on intact cells of the cyanobacterium Spirulina platensis: characterization of the alterations in the thylakoid membranes*, J. Photochem. Photobiol. B:Biol. 54 (2000) 61-66
- [220] Rangsayatorn N., Upatham E.S., Kruatrachue M., Pokethitiyook, Lanza G.R., *Phytoremediation potential of Spirulina (Arthrospir) platensis biosorption and toxicity studies on cadmium*, 2002, Environ. Pollut., 119, 45-53
- [221] Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn, *Biology of plants*, książka elektroniczna www.whfreeman.com/raven/index.htm

- [222] Ribeiro M.J.P., Labrincha J.A., *Spray-dried calcined clays in water filtration columns used for chromium removal*, 1998, Colloid Polym. Sci., 276, 723-729
- [223] Richmond A., *Phototrophic microalgae*, in *Biotechnology*, Vol. 3, Rehm H.J. and Reed F. Eds., Verlag Chemie, Weinheim, 1983, 109
- [224] Richmond A., *Spirulina*, w: Borowitzka M.A., Borowitzka L.J.(Eds.), *Micro-Algal Biotechnology*, 1988, Cambridge University Press, Cambridge, str. 85-121
- [225] Richmond A.E., *Microalgal Biotechnology at the turn of the millenium: a personal view*, 2000, J. Appl. Phycol., 12, 441-451
- [226] Richmond A.E., *Microalgalculture*, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 4, 369, 1986
- [227] Richmond A.E., *Handbook of Microalgal mass Culture*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1986 1.
- [228] Rijnaarts H.H.M., Norde W., Lyklema J., Zehnder A.J.B., *The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion*, 1995, Colloid Surface B, 4, 191-197
- [229] Robles L., Aller A., *Determination of cadmium in biological and environmental samples by slurry electrothermal atomic absorption spectrometry*, 1995, Talanta, 42(11), 1731-1744
- [230] Rollemberg M.C., Goncalves M.S.L., *Kinetics of uptake of cadmium by Chlorella marina in different media*, 2000, Bioelectroch., 52, 57-62
- [231] Rose P., Maart B., Dunn K., Rwsell R., Britz B., *High rate algal oxidation ponding for the treatments of tannery effluents*, 1996, Wat. Sci. Tech. 33(7), 219-227
- [232] Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa, z dnia 5 listopada 1991 r. w sprawie klasyfikacji wód oraz warunków, jakim powinny odpowiadać ścieki wprowadzane do wód lub do ziemi., (Dz. U. z dnia 16 grudnia 1991 r. nr 91.116.503 i 01.115.1229)
- [233] Rubio, C.F., Fernandez, A.F.G., Perez, S.J.A., Camacho, G.F., Grima, M. E., *Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture*, 1999, 92, 71-86
- [234] Ryer A., *Light measurement handbook*, International Light Inc., Newburyport, USA, 1998
- [235] Sadowski Z., *Effect of biosorption of Pb(II), Cu(II) and Cd(II) on the zeta potential and flocculation of Nocardia sp.*, 2001, Miner. Eng., 14(5), 547-552
- [236] Saint C.P., Fergusson K.M., *Molecular Identification of Toxic Cyanobacteria*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, 225-243
- [237] Salem H.S., Chilingarian G.V., *Determination of specific surface area and mean grain size from well-log data and their influence on the physical behavior of offshore reservoirs*, 1999, J. Petrol., 22, 241-252
- [238] Sasaki K., Marquez F.J., Nishio N., Nagai S., *Promotive Effect of 5-Aminolevulinic Acid on the Growth and Photosynthesis of Spirulina platensis*, 1995, J. Ferment. Bioeng., 79, 453-457
- [239] Sasson A., *Foreword*, w: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, cell biology and biotechnology.*, 1997, Taylor & Francis, New York, str. xi-xiii
- [240] Sawayama S., *Recent studies on Production of Biofuel and Biopolyesters with Anoxgenic Phototrophic Bacteria*, w: Kojima H., Lee Y.K., (Eds.), *Photosynthetic Microorganisms in Environmental Biotechnology*, 2001, Springer, Berlin, str. 27-41
- [241] Schansker G., van Rensen J.J.S., *Mechanism of photoinhibition in pea thylakoids: effects of irradiance level and pH*, 1996, Biochim. Biophys. Acta, 1276, 239-245
- [242] Scheffler, G.H., 1966, *Carbon activated* w: *Snell-Ettra Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, 8, 139
- [243] Schiewer S., Volesky B., *Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of divalent metal ions and protons*, 1997, Environ. Sci. Technol. 31, 2478-2485.
- [244] Schiewer S., Volesky B., *Advances in Biosorption of Heavy Metals*, w: *Encyclopedia of Bioprocess Engineering*, Flickinger, MC & Drew, SW, eds. Wiley, NY, 1999, 433-453
- [245] Schiewer S., Volesky B., *Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of protons*, 1997, Environ. Sci. Technol. 31, 1863-1871.
- [246] Schiewer S., Volesky B., *Mathematical evaluation of experimental and modeling errors in biosorption*, 1995, Biotechnol. Tech. 9, 843-848.
- [247] Schiewer S., Volesky B., *Modeling multi-metal ion exchange in biosorption*, 1996, Environ. Sci. Technol. 30, 2921-27.
- [248] Schiewer S., Volesky B., *Modelling of the proton-metal ion exchange in biosorption*, 1995, Environ. Sci. Technol. 29, 3049-3058
- [249] Schiewer S., Wong M.H., *Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae*, 2000, Chemosphere 41, 271-282
- [250] Schlegel H.G., *Mikrobiologia ogólna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1996, str. 163
- [251] Shi X.M., Liu H.J., Zhang X.W., Chen F., *Production of biomass and lutein by Chlorella protothecoides at various glucose concentrations in heterotrophic cultures*, 1999, Process Biochem., 34, 341-347
- [252] Siegel B.Z., Siegel S.M., *The chemical composition of algal cell walls*, 1973, Crit. rev. Microbiol., 3,1
- [253] Singh R.J., Kothari R.M., Sharma R.K., Ramamurthy V., *Enhancement of Spirulina Biomass Productivity by a Protein Hydrolysate*, 1995, Appl. Biochem. Biotechnol., 50, 285-290
- [254] Soeder C.J., *An Historical Outline of Applied Algology*, w: Richmond, A. (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*, 1986, CRC Press, Boca Raton, FL, str. 25-42
- [255] Sokół W., *Bioutlenianie w przepływowym reaktorze zbiornikowym*, 1982, Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 3, 3-7

- [256] Sorokin C., *Tabular comparative data for the low- and high temperature strains of Chlorella*, 1959, Nature (London), 184, 613
- [257] Spetea C., Hideg E., Vass I., *Low pH accelerates light-induced damage of photosystem II by enhancing the probability of the donor-side mechanism of photoinhibition*, 1997, Biochim. Biophys. Acta, 1318, 275-283
- [258] Steele, J.H., In: Lapidus, L., Amundson, N.R., (Eds.), *Microbial Kinetics and Dynamics in Chemical Reactor Theory*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1977, 405-483
- [259] Streat M., Naden D., *Ion exchange and sorption processes in hydrometallurgy. Critical reports on applied chemistry*, v.19, Jon Wiley & Sons, Chichester, 1987
- [260] Sunda W., *Trace Metal-Phytoplankton Interactions in Aquatic Systems*, w: Lovley D.R. (Ed.), *Environmental Microbe-Metal Interactions*, 2000, ASM Press, Washington D.C., str. 79-107
- [261] Sunda W.G., Huntsman S.A., *Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems*, 1998, Sci. Total. Environ., 165-181
- [262] Szewczyk K.W., *Bilansowanie i Kinytika Procesów Biochemicznych*, Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1993
- [263] Tadros M.G., Smith W., Joseph B., Phillips J., *Yield and Quality of Cyanobacteria. Spirulina maxima in Continuous Culture in Response to Light intensity*, 1993, Appl. Biochem. Biotechnol., 39/40, 337-347
- [264] Tadros M.G., Smith W., Joseph B., *Yield and Quality of Cyanobacteria Spirulina maxima in Continuous Culture in Response to Sodium Chloride*, 1995, Appl. Biochem. Biotech., 51/52, 275-281
- [265] Tamiya, H., Hase, E., Shibata, K., Mituya, A., *Kinetics of growth of Chlorella with special reference to its dependence on quantity of available light and on temperature*, w: Burlew, J.S. (Ed.) *Algal Culture from Laboratory to pilot Plant*. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, 1953 pp. 204-232
- [266] Ting Y.P., Lawson F., Prince I.G., *The uptake of heavy metal ions by algae*, 1990, Aust. J. Biot., 4,3, 15-20
- [267] Ting Y.P., Lawson F., Prince Y.G., *Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga Chlorella vulgaris: Part I. Individual Ion Species*, 1989, Biotechnol. Bioeng., 34, 990-999
- [268] Ting Y.P., Lawson F., Prince Y.G., *Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga Chlorella vulgaris: Part II. Multi-Ion Situation*, 1991, Biotechnol. Bioeng., 37, 445-455
- [269] Tiravanti G., Petruzzelli D., Passino R., *Pretreatment of tannery wastewaters by an ion exchange process for Cr(III) removal and recovery*, 1997, Wat. Sci. Tech., 36, 197-207
- [270] Tomaselli A., *Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of Arthrospira (Spirulina) maxima and Arthrospira (Spirulina) platensis*, w: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, cell biology and biotechnology*, 1997, Taylor & Francis, New York, str. 1-15
- [271] Torzillo G., Carlozzi P., Pushparaj B., *A Two-Plane Tubular Photobioreactor for Outdoor Culture of Spirulina*, 1993, Biotechnol. Bioeng., 42, 891-898
- [272] Travieso L., Canizares O., Borja R., Benitez F., Dominguez R., Dupeyron R., Valiente V., *Heavy Metal Removal by Microalgae*, 1999, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62, 144-151
- [273] Treen-Sears M.E., Volesky B., Neufeld R.J., *Ion exchange/Complexation of the uranyl ion by Rhizopus biosorbent*, 1984, Biotechnol. Bioeng. 26, 123-129.
- [274] Treen-Sears M.E., Martin S.M., Volesky B., *Propagation of Rhizopus biosorbent*, 1984, Appl. Environ. Microbiol. 48, 137-141.
- [275] Tsezos M., *Recovery of Uranium from biological adsorbents – desorption equilibrium*, 1984, Biotechnol. Bioeng., 26, 973
- [276] Van der Wal, A., Norde, W., Zhnder, J.B., Lyklema, J., *Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria*, 1997, Colloids Surfaces B: Biointerfaces 9, 81-100
- [277] Van Oorschot, J.L.P., *Conversion of light energy in algal cultures*, 1955, Med. van Lund. Wang, 55, 225-277
- [278] Verity P.G., *Effects of temperature, irradiance and daylength of the marine diatom Leptocylindrus danicus cleve. I. Photosynthesis and cellular composition*, 1981, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 55, 79
- [279] Vieira R.H.S.F., Volesky B., *Biosorption: a solution to pollution ?*, 2000, Internatl. Microbiol. 3, 17-24.
- [280] Vilchez C., Garbayo I., Lobato M.V., Vega J.M., *Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal*, 1997, Enzyme Microb. Tech., 20, 562-572
- [281] Volesky B., *Biosorbents for metal recovery*, 1987, Trends Biotechnol. 5, 96-101.
- [282] Volesky B., *Biosorption of Heavy Metals*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1990
- [283] Volesky B., *Biosorption: Application aspects - process simulation tools* - Internet: <http://ww2.mcgill.ca/biosorption/publication/BVibs01.pdf>
- [284] Volesky B., *Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century*, 2001, Hydromet., 59 (2-3) 203-216.
- [285] Volesky B., Figueira M.M., Ciminelli V.S., Roddick F.A., *Biosorption of metals in brown seaweed biomass*, 2000, Wat. Res., 34, 196-204
- [286] Volesky B., Holan Z.R., *Biosorption of heavy metals*, 1995, Biotechnol. Prog., 11, 235-250
- [287] Volesky B., May H., Holan, Z.R., *Cd biosorption by Saccharomyces cerevisiae*, 1993, Biotech. Bioeng. 41, 826-829.
- [288] Volesky B., May-Phillips H. A., *Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae*, 1995, J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, 797-806.
- [289] Volesky B., Prasetyo I., *Cadmium removal in a biosorption column*, 1994, Biotechnol. Bioeng., 43, 1010-1015.

- [290] Vonshak A. et al., *Production of Spirulina biomass; effects of environmental factors and population density*, 1982, Biomass, 2, 175
- [291] Vonshak A., *Microalgae: laboratory growth techniques and biotechnology of biomass production*, w: Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P. (Eds.), *Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A field laboratory manual*, 1993, Chapman&Hall, London, str. 337-345
- [292] Vonshak A., *Mixotrophic growth modifies response of Spirulina (Arthrospira) platensis (cyanobacteria) cells to light*, 2000, J. Phycol., 36, 675-679
- [293] Vonshak A., *Outdoor Mass Production of Spirulina: The Basic Concept*, w: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, cell biology and biotechnology*, 1997, Taylor & Francis, New York, str. 79-99
- [294] Vonshak A., *Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry*, w: Vonshak, A., *Spirulina platensis (Arthrospira). Physiology, cell biology and biotechnology*, 1997, Taylor & Francis, New York, str. 43-65
- [295] Wal A et al., *Determination of the total charge in the cell walls of Gram-positive bacteria*, Colloids Surfaces M:Biointerfaces, 1997, 9, 81
- [296] Wang X., Dei R.C.H., *Effects of major nutrient additions on metal uptake in phytoplankton*, 2001, Environ. Pollut., 111, 233-240
- [297] Wang X., Ma Y., Su Y., *Determining surface areas of marine alga cells by acid-base titration method*, 1997, Chemosphere, 35(5), 1131-1141
- [298] Ward C.H., Moyer J.E., Vela G.R., *Studies on bacteria associated with Chlorella pyrenoidosa TX71105 in mass culture*, 1964, Dev. Ind. Microbiol., 6, 213
- [299] Weissman J.C., Goebel R.P., Benemann J.R., *Photobioreactor Design: Mixing, Carbon Utilization, and Oxygen Accumulation*, 1988, Biotechnol. Bioeng., 31, 336-344
- [300] White C., Gadd G.M., *Determination of metals and metal fluxes in algae and fungi*, 1995, Sci. Total. Environ., 176, 107-115
- [301] Wilde E.W., Benemann J.R., *Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae*, 1993, Biotech. Adv., 11, 781-812
- [302] Wong Y.-S., Tan T.F.Y., *Wastewater treatment with algae*, Springer-Verlag, U.S.A., 1998
- [303] Yang Ch., Hua Q., Shimizu K., *Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions*, 2000, Biochem. Eng. J., 6, 87-102
- [304] Yang J., Volesky B., *Modeling the uranium-proton ion exchange in biosorption*, 1999, Envir. Sci. Technol. 33, 44079-4085.
- [305] Yang J., Volesky B., *Biosorption of uranium by Sargassum biomass*, 1999, Wat. Res., 33, 3357-3363.
- [306] Yang J., Volesky B., *Cd biosorption rate in protonated Sargassum biomass*, 1999, Environ. Sci. Technol. 33, 751-757.
- [307] Yang J., Volesky B., *Intraparticle diffusivity of Cd ions in a new biosorbent material*, 1996, J. Chem. Technol. Biotechnol. 66, 355-364.
- [308] Yee N., Fein B., Daughney J., *Experimental study of the pH, ionic strength, ad reversibility behavior of bacteria-mineral adsorptin*, 2000, Geochim. Cosmochim. Ac., 64(4), 609-617
- [309] Yokota T., Hizume M., Ohtake T., Takahashi K., *A new growth kinetic model for photo-autotrophic microalgae culture*, 1994, J. Chem. Eng. Jpn., 27(3), 399-403
- [310] Yu J.W., Neretnieks I., *Single-component and multicomponent adsorption equilibria on activated carbon of methylcyclohexane, toluene, and isobutyl methyl ketone*, 1990, Ind. Eng. Chem. Res., 29, 220-231
- [311] Yun Y.S., Park D.H., Park J.M., Volesky B., *Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass*, 2001, Envir. Sci. Technol. 35, 4353-58.
- [312] Zarrouk, C., *Contribution l'e'tude d'une cyanophyce e. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthe'se de Spirulina maxima (Setch. et Gardner) Geitler*. PhD thesis, University of Paris, 1966, Paris, France
- [313] Zeng M.T., Vonshak A., *Review: Adaptation of Spirulina platensis to salinity-stress*, 1998, Comp. Biochem. Phys. A, 120, 113-118
- [314] Zhang X.W., Gu D.X., Liu X., Guan Y.Z., *A three-dimensional model for a fermentation process: Fermentation plane*, 1997, Enzyme Microb. Technol., 21, 165-169
- [315] Zhang X.W., Zhang Y.M., Chen F., *Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of Spirulina platensis*, 1999, Process Biochem., 34, 477-481
- [316] Zhang X.W., Zhang Y.M., Chen F., *Kinetic models for phycocyanin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga Spirulina platensis*, 1998, J. Ind. Microbiol., 21, 283-288
- [317] Zhou J.L., Huang P.L., Lin R.G., *Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae*, 1998, Environ. Pollut., 101, 67-75