

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

10 (4) 2011



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum*

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

Wiesław Nagórko (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn), Florian Gambuś (Kraków),
Franciszek Kluza (Lublin), Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Stanisław Socha (Siedlce),
Waldemar Uchman (Poznań), Bogdan Lasota (Szczecin)

Scientific Board of *Biotechnology*

Danuta Witkowska (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland) – chairman
e-mail: danuta.witkowska@up.wroc.pl

Włodzimierz Bednarski (University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland),
Włodzimierz Grajek (Poznań University of Life Sciences, Poland), Anna Maraz (Corvinus
University Budapest, Hungary), Zdzisław Targoński (Lublin University of Life Science, Poland)
Vesna Zechner-Krpan (University of Zagreb, Croatia)

Covered by: Agro, Ulrich's Database, Copernicus Index, EBSCOhost

ISSN 1644–065X (print) ISSN 2083–8654 (on-line)

Print edition is an original (reference) edition

Cover design
Daniel Morzyński

Text editor
Ewa Jaworska, e-mail: ewa.jaworska@up.wroc.pl

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Sopocka 23, 50-344 Wrocław, Poland
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,70 Printing sheets: 2,75

Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

Szanowni Państwo,

Przekazujemy Państwu kolejny zeszyt ACTA SCIENTIARUM POLONORUM serii Biotechnologia, czasopisma naukowego wydawanego przez wszystkie polskie uczelnie rolnicze i przyrodnicze w 14 seriach. Seria Biotechnologia ukazuje się nakładem Wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu od 2002 roku.

Czasopismo nasze publikuje oryginalne prace z zakresu biotechnologii drobnoustrojów, roślin i zwierząt, z naciskiem na aspekty praktyczne. Publikowane są oryginalne prace badawcze, a także artykuły o charakterze monograficznym, w języku polskim lub angielskim ze streszczeniami w obu językach. Wszystkie opisy rysunków i tabel są dwujęzyczne. Prace są recenzowane przez najlepszych specjalistów z danej dziedziny.

Od 2007 roku czasopismo wydawane jest jako kwartalnik. Wymogi redakcyjne oraz szczegóły dotyczące przygotowania artykułu można znaleźć na stronie www.acta.media.pl

Zespół Redakcyjny

Dear Readers,

It is great pleasure to introduce you the next issue of ACTA SCIENTIARUM POLONORUM Biotechnologia, a scientific journal published by all polish universities of environmental sciences. The series of Biotechnologia is released by publishing house of Wroclaw University of Environmental and Life Sciences since 2002.

The journal publishes original papers in the field of biotechnology of microorganisms, plants and animals with emphasis on practical aspects. There are published both original research articles and monographs, in Polish or English, with abstracts in both languages. The all figures' and tables' captions are bilingual. The papers are reviewed by the best specialists in the field. This issue is also dominated by the application problems.

Since 2007 the journal has been published as quarterly. The editorial requirements and details concerning the instruction for authors can be found et: www.media.pl.

Editorial Team

GLINKA HALOIZYTOWA ORAZ WĘGIEL AKTYWNY JAKO POTENCJALNE SORBENTY W PROCESIE SKUTECZNEGO ODBARWIANIA BURACZANEGO WYWARU MELASOWEGO

Małgorzata Krzywonos, Katarzyna Szymańska

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

Streszczenie. Buraczany wywar melasowy jest produktem ubocznym powstającym podczas wytwarzania etanolu z melasy buraczanej. Jego ciemnobrązowa barwa jest efektem obecności karmeli, melanoidyn oraz produktów alkalicznej degradacji inwertu. Ciemnobrązowe zabarwienie wywaru nie jest usuwane metodami biologicznymi. Celem prezentowanych badań było porównanie zdolności i wydajności dekoloryzacji buraczanego wywaru melasowego na złożu glinki haloizytowej z wynikami uzyskanymi na złożach pylistego węgla aktywnego. Zbadano wpływ pH i stężenia wywaru, czasu reakcji z nośnikiem oraz ilości badanego złoża sorpcyjnego na skuteczność odbarwiania wywaru melasowego.

Słowa kluczowe: melasowy wywar buraczany, dekoloryzacja, węgiel aktywny, glinka haloizytowa

WSTĘP

Efektem ubocznym przetwórstwa buraków cukrowych są odpady w postaci liści buraczanych, wysłodków, szlamu defekosaturacyjnego i melasy [Zielnica i in. 2000]. Powstałą melasę wykorzystuje się efektywnie w przemyśle fermentacyjnym. Produkcji 1 dm³ etanolu z fermentacji poprodukcyjnej melasy towarzyszy powstawanie od 8 do 15 dm³ wywaru [Mane i in. 2006]. Zagospodarowanie wywarów gorzelnicznych stanowi ogromne wyzwanie zarówno z punktu widzenia ekonomicznego, jak i środowiskowego. Melasowy wywar gorzelniczny (buraczany i trzcinowy) charakteryzują kwaśny odczyn, silny, charakterystyczny zapach oraz ciemnobrunatne zabarwienie [Coca i in. 2004, Sattyawali i Balakrishnan 2008]. Głębokie zabarwienie wywaru melasowego spowodowane jest obecnością brunatnych pigmentów – produktów alkalicznego rozkładu inwertu,

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Krzywonos, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, Katedra Inżynierii Bioprocusowej, ul. Komandorska 118/120, 53 345 Wrocław, e-mail: małgorzata.krzywonos@ue.wroc.pl

barwników melanoidynowych oraz produktów karmelizacji sacharozy [Mane i in. 2006]. Wymienione substancje barwne są związkami opornymi na usuwanie tradycyjnymi metodami. Konwencjonalne metody stosowane takie jak fermentacja beztlenowa czy wykorzystanie osadu czynnego nie są wystarczające dla odbarwienia wywaru [Satyawali i Balakrishnan 2008]. Akumulacja opisanych ciał barwnych jest wysoce niewskazana ze względu na ich toksyczne właściwości. Jako produkty m.in. spontanicznie zachodzącej reakcji Maillarda mają silnie reaktywne grupy karboksymetylowe, będące potencjalnymi cytotoksykantami – inhibitorami wzrostu i żywotności mikroorganizmów zaangażowanych w biodegradację [Shayegan i in. 2005, Tessier 2009]. Obok biologicznego usuwania barwników wywarów melasowych wykorzystuje się też metody fizykochemiczne. Jedną z nich jest zastosowanie węgla aktywnego, który swoje specyficzne właściwości adsorpcyjne i adsorpcyjne zawdzięcza rozbudowanej strukturze mikrospor i mezopor oraz wysokiemu stopniowi reaktywności powierzchniowej, za którą odpowiada jego polarna i hydrofobowa natura [Satyawali i Balakrishnan 2008]. Ze względu na koszty procesu oczyszczania z wykorzystaniem węgla aktywnych, poszukuje się innych materiałów, które ze względu na swoją budowę i właściwości fizykochemiczne mogłyby prowadzić równie skuteczną jak węgiel aktywny sorpcję substancji barwnych. Interesującym zagadnieniem wydaje się być próba wykorzystania haloizytu, naturalnie wydobywanego minerału pokładowego, w roli aktywnego sorbenta [Lee i in. 2004]. W strukturze haloizytu znajdują się nanorurki o średnicy kilkudziesięciu nanometrów, generujące dość dużą porowatość i wysoką sorpcyjność. Ogromne znaczenie w potencjalnym zastosowaniu glinki haloizytowej do oczyszczania ścieków ma jej zdolność do trwałego wiązania metali ciężkich (m.in. chromu, niklu, kadmu, rtęci), wpływających inhibująco na wzrost mikroorganizmów wykorzystywanych do biodegradacji. Dodatkowo, w przeciwieństwie do złóż sorpcyjnych zbudowanych z węgla aktywnego, biofiltry składające się z haloizytu charakteryzują się małą wrażliwością na wilgotność, zachowując wysoką sprawność przez długi czas użytkowania [Joussein i in. 2005]. Dotychczas prowadzone badania nad dekoloryzacją dotyczyły głównie trzcinowego wywaru melasowego [Pant i Adholeya, 2007]. Nie znaleziono informacji na temat dekoloryzacji buraczanego wywaru melasowego z wykorzystaniem glinki haloizytowej.

Celem prezentowanych badań było porównanie zdolności i wydajności dekoloryzacji buraczanego wywaru melasowego na złożu glinki haloizytowej z wynikami uzyskanymi na złożach pylistego węgla aktywnego. Zbadano wpływ pH i stężenia wywaru, czasu reakcji z nośnikiem oraz ilości badanego złoża sorpcyjnego na skuteczność odbarwienia wywaru melasowego.

MATERIAŁY I METODY

Buraczany wywar melasowy

Buraczany wywar melasowy poddawany odbarwianiu pochodził z gorzelnii należącej do Zakładów Wytwórczych CHEKO sp. z o.o. we Włocławku i przed użyciem został zamrożony w temp. -20°C . Jego pH wynosiło 5, gęstość $22^{\circ}\text{B}lg$. Wywar został scharakteryzowany poprzez następujące wielkości ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$): chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) 94,1; glicerol 9,71; glukoza 0,001; kwas mlekowy 18,4; kwas octowy 2,07; kwas

piroglutaminowy 8,16; kwas izomasłowy 5,95; kwas winowy 0,8; produkty alkalicznego rozkładu inwertu (PARI) 20,07; karmele 1,75; i melanoizyny 2,91.

Przed oznaczeniami próbki wywaru zostały odwirowane z wykorzystaniem wirówki laboratoryjnej (Sigma® 4K15) przy prędkości 8000 g przez 15 minut. Supernatant zamrożono i w takim stanie przechowywano w celu użycia go do dalszych analiz.

Nośniki

Glinkę haloizytu (GH) pozyskano ze złóż naturalnych w Szklarach k. Ząbkowic Śląskich. Pylisty węgiel aktywny (PWA) – NORIT SX2 cz.d.a. został zakupiony w POCH, Gliwice.

Sposób prowadzenia dekoloryzacji

Dekoloryzację prowadzono na wytrząsarce laboratoryjnej (IKA Stone Shaker) w kolbach wstrząsanych ($100 \text{ obrotów} \cdot \text{min}^{-1}$) o pojemności 250 cm^3 wypełnionych 100 cm^3 dekoloryzowanego wywaru. Po upływie 0,5; 1; 1,5; 2 oraz po 24 h zmierzono ekstynkcję (spektrofotometr Ultraspec III, Pharmacia LKB) dla długości fali 250, 282, 300, 475 nm. W próbie początkowej i końcowej określano zmiany zawartości barwników wywaru metodą HPLC.

Badania przeprowadzono na trzech etapach. Po pierwsze określono optymalne rozcieńczenie wywaru melasowego (100, 75, 50, 25, 15 i 5%) w stosunku do dawki 5 g każdego z wymienniczy jonowych. Drugi etap miał na celu zbadanie wpływu dawki nośnika (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 i 5 g) na efektywność procesu odbarwiania. Stężenie wywaru, jakie zastosowano na tym etapie, to optymalne wybrane na pierwszym etapie równe 25%. Następnie zbadano wpływ pH (dla wartości 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 i 11) na stopień odbarwienia wywaru. Wartość pH regulowano 0,1 M HCl i 33% NaOH. Zastosowano wywar o stężeniu 25% i po 5 g każdego z nośników.

Każdy z eksperymentów wykonywano w 3 powtórzeniach. Prezentowane dane są średnią uzyskaną z dokonanych pomiarów.

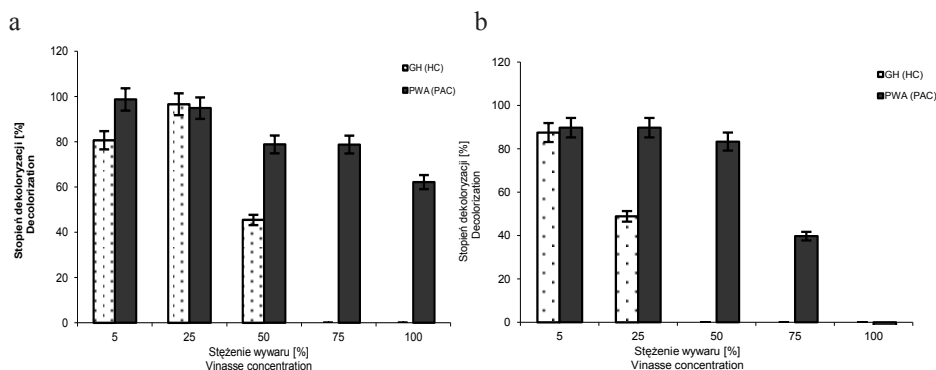
Metody analityczne

Oznaczenia glukozy, glicerolu oraz kwasów organicznych (mlekowego, octowego, piroglutaminowego, winowego i izomasłowego) wykonano metodą HPLC. Wykorzystano aparat firmy Knauer z detektorem UV-VIS i refraktometrycznym, wyposażony w kolumnę Phenomenex ROA Organic Acids o wymiarach: 7,8 mm (średnica wewnętrzna) x 300 mm (długość). Jako eluent zastosowano 0,005 M H_2SO_4 , którego prędkość przepływu wynosiła $0,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 40°C i przy długości fali 210 nm. Sumaryczną zawartość barwników w wywarze oznaczano metodą spektrofotometryczną przy długości fali 475 nm [Bharagava i in. 2009]. Skuteczność dekoloryzacji wyrażano w następujący sposób: różnica między początkową i końcową absorbancją, podzielona przez absorbancję początkową. Stężenie melanoizyn (M), karmeli (K) i produktów otrzymywanych podczas alkalicznego rozkładu inwertu (I) obliczono, wykorzystując pomiar absorbancji przy długości fal 250 nm, 282 nm, 300 nm [Sapronov 1963]. Do określenia zawartości substancji barwnych w próbach końcowych dla procesów, w których uzyskano najwyższy stopień odbarwienia oraz dla odpowiednich prób kontrolnych, wykorzystano także metodę HPLC (zestaw Knauer z detektorem UV-VIS; typ kolumny: Agela Unisol 18, $5 \mu\text{m}$; rozmiar kolumny: długość 250 mm, średnica wewnętrzna: 4.6 mm; eluent: acetonitryl/ H_2O 90%:10%; prędkość przepływu:

0,5 cm³·min⁻¹; temperatura: 27°C). Oznaczeń dokonano przy długości fali 290 nm [Bharagava i in. 2009]. Zmiany w zawartości substancji barwnych oceniano przez stopień redukcji pola powierzchni, ograniczonego krzywą chromatogramu, obliczonego dla czasu retencji RT od 3,3 do 11,2 min oraz stopień redukcji wysokości pików o średnim RT = 5,3 min.

WYNIKI I DYSKUSJA

Na pierwszym etapie zbadano wpływ stężenia wywaru na stopień dekoloryzacji wywaru. Zauważono, że gdy stosowano jako nośnik glinę haloizytową, po 0,5 h tylko dla stężenia 5, 25 i 50% wywaru, zachodziło jego odbarwienie (rys. 1 a). Przy wyższych stężeniach nie zauważono dekoloryzacji wywaru (rys. 1 a i b). Gdy użyto pylistego węgla aktywnego, nawet w przypadku wywaru nierozcieńczonego poddawanego badaniom, po 0,5 h osiągnięto wysoki stopień dekoloryzacji (do 60%). Dla tego nośnika najwyższy stopień dekoloryzacji (powyżej 95%) uzyskano po 0,5 h od rozpoczęcia filtracji dla wywaru o stężeniu 5 i 25% (rys. 1a).



Rys. 1. Wpływ stężenia wywaru na stopień dekoloryzacji wywaru po a) 0,5 h; b) 24 h

Fig. 1. Effect of vinasse concentration on the extent of colour removal after a) 0.5 h; b) 24 h

Najwyższy stopień odbarwienia dla glinki (99,3%) odnotowano dla 25% wywaru po 1 h od rozpoczęcia filtracji (dane nieprezentowane). Po 24 h zanotowano spadek stopnia dekoloryzacji wywaru dla obu stosowanych nośników (rys. 1 a i b).

Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność do odbarwiania rozcieńczonego wywaru melasowego 5 i 25%. Zaobserwowano zarówno zmniejszenie pola powierzchni, jak i wysokości pików po 24 h reakcji z nośnikami (tab. 1). Zmniejszenie pola powierzchni oraz wysokości pików zanotowano także dla wywaru o stężeniu 50% na obu stosowanych złożach. Jednak wartości te są dużo niższe niż dla wywaru o niższych stężeniach i nie znalazły potwierdzenia w uzyskanym stopniu dekoloryzacji (rys. 1). Dla wywaru nierozcieńczonego oraz o stężeniu 75% pole powierzchni i wysokość pików pozostały bez zmian. Zmniejszenie pola powierzchni i wysokości w chromatogramach dekoloryzowanych próbek wywaru melasowego zaobserwowali także Bharagava i in. [2009] przy dekoloryzacji melasowego wywaru trzcinowego oraz Krzywonos [2012] podczas biologicznej dekoloryzacji wywaru buraczanego z wykorzystaniem szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*.

W badaniach Krzywonos i Łapawy [2012] stwierdzono, że wysokość najwyższego pików była znacznie pomniejszona w porównaniu z próbą kontrolną, oraz że ilość pików znacznie się zmniejszyła w porównaniu z próbą kontrolną przy dekoloryzacji melasowego wywaru buraczanego z użyciem żywic jonowymiennych. W innych badaniach Krzywonos i Seruga [2012], wykorzystując bakterie z gatunku *Lactobacillus plantarum*, odnotowali 57,9% stopień redukcji głównego pików w procesie dekoloryzacji buraczanego wywaru melasowego.

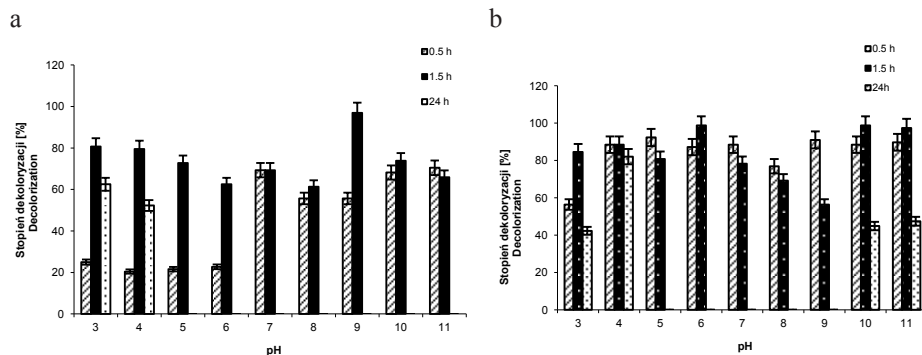
Tabela 1. Wpływ stężenia wywaru na stopień redukcji pola powierzchni oraz wysokości pików
Table 1. Effect of vinasse concentration on the extent of reduction in peak area and peak height

Stężenie wywaru Vinasse concentration	Nośnik Sorbent	Stopień redukcji [%] Removal	
		Pole powierzchni piku Peak area	Wysokość pików Peak height
100%	GH	0	0
	PWA	0	0
75%	GH	0	0
	PWA	0	0
50%	GH	34	42
	PWA	15	21
25%	GH	47	46
	PWA	64	63
5%	GH	65	27
	PWA	83	80

Ponieważ zarówno dla jednego, jak i drugiego stosowanego nośnika najwyższy stopień dekoloryzacji, mierzony przez pomiar absorbancji przy długości fal 475 nm, otrzymano dla wywaru o stężeniu 25% (rys. 1 a i b), do kolejnego etapu wybrano właśnie to rozcieńczenie jako optymalne i zastosowano je na kolejnym etapie badań.

Podczas badania wpływu pH wywaru na stopień jego odbarwienia pierwsze 0,5 h reakcji wywaru melasowego o pH początkowym 3, 4, 5 i 6 ze złożem GH skutkowało umiarkowaną dekoloryzacją (22–25%) (rys. 2a). Wyższy stopień dekoloryzacji (powyżej 55%) zanotowano dla początkowego pH = 7 i wyższego (rys. 2a). Dla czasu reakcji 1,5 h odnotowano wzrost stopnia dekoloryzacji wywaru w całym badanym zakresie pH (rys. 2a).

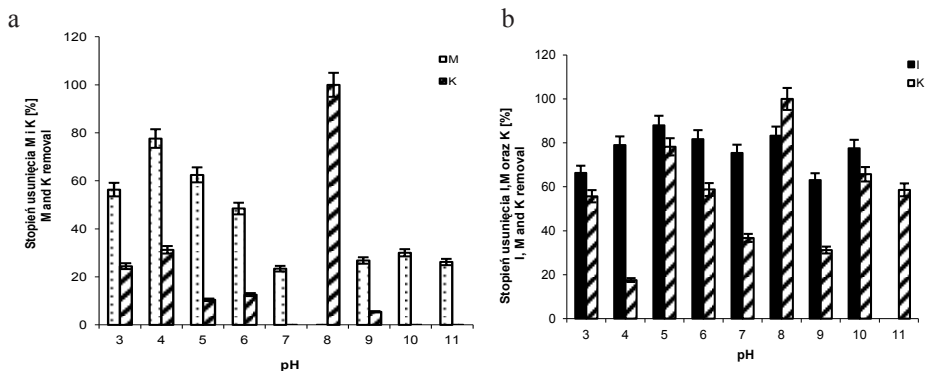
Po 24 h od rozpoczęcia filtracji dekoloryzacja dla pH = 3 i 4 obniżyła się w stosunku do wyników uzyskanych po upływie 1,5 h, natomiast w wyższych zakresach pH (od 5 do 11) odnotowano brak lub wzrost zabarwienia roztworu. Pomimo doniesień literaturowych o niskiej wrażliwości glinki haloizytowej na odczyn środowiska, w jakim się znajduje [Joussein i in. 2005], zauważyć można wyraźne preferencje haloizytu do skrajnych wartości pH wywaru. Pojawiający się po upływie doby wzrost zabarwienia roztworu wynikał prawdopodobnie z przenikania uwodnionych tlenków żelaza i manganu zawartych w glince do odbarwanego roztworu wywaru.



Rys. 2. Wpływ pH wywaru na efektywność dekoloryzacji 25% wywaru na złożu GH (a) i PWA (b) w czasie 0,5 h; 1,5 h oraz 24 h

Fig. 2. Effect of pH on decolorization of 25% vinasse using HC (a) and PAC (b) after 0.5 h, 1.5 h and 24 h

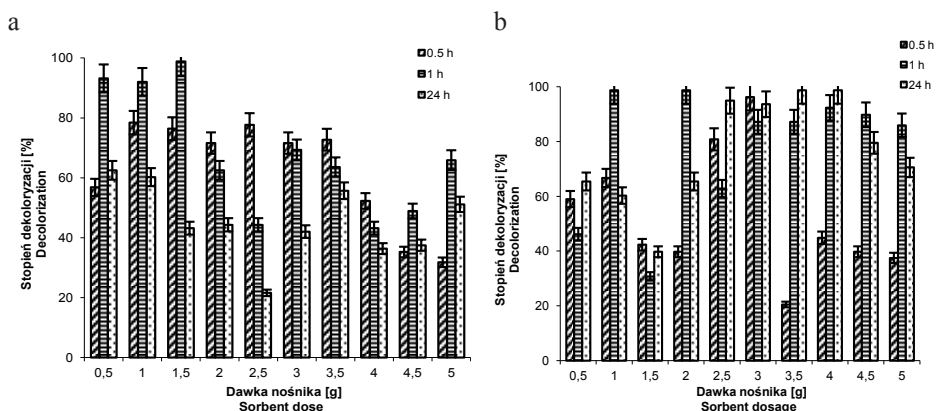
W eksperymentach, gdy nośnikiem był PWA, uzyskano znacznie wyższe stopnie dekoloryzacji (rys. 2b). Najwyższy stopień dekoloryzacji (98,7%) uzyskano przy początkowym pH = 6, po czasie filtracji 1,5 h. Najniższą wartość stopnia dekoloryzacji (56,4%) zanotowano po 0,5 h reakcji dla początkowego pH=3. W przypadku PWA niezależnie od czasu trwania filtracji (do 2 h) oraz pH filtrowanego wywaru stopień odbarwienia utrzymywał się na wysokim poziomie ok. 80%. Wydłużenie czasu reakcji do 24 h, podobnie jak w przypadku glinki haloizytowej, spowodowało znaczne obniżenie stopnia dekoloryzacji lub brak dekoloryzacji (rys. 2b), spowodowane jednak nie wzrostem stężenia substancji barwnych, a przenikaniem do roztworu cząstek sadzy, a co za tym idzie, zmniejszającą się przepuszczalnością światła UV badanego roztworu. Wysoki stopień dekoloryzacji wywaru (42 i 82%) uzyskiwano po 24 h reakcji w przypadku pH początkowego PWA równego odpowiednio 3 i 4. Podobne zależności uzyskano w przypadku GH (odpowiednio 62,5 i 52%). Analizując wpływ pH roztworu melasowego na efektywność usuwania związków poszczególnych barwników, tj. melanoidynów (M), karmeli (K) i produktów otrzymywanych podczas alkalicznego rozkładu inwertu (I), zauważono, że po 0,5 h w przypadku GH nie zanotowano usunięcia z wywaru produktów alkalicznego rozkładu inwertu. W przypadku stosowania PWA stężenie melanoidynów pozostało nie zmienione w całym badanym zakresie pH (rys. 3). Na złożu PWA po 0,5 h w całym badanym zakresie pH, z wyjątkiem pH = 11, stopień usuwania produktów alkalicznego rozkładu inwertu był wysoki i wyniósł ponad 63% (rys. 3b). Podczas półgodzinnej filtracji odnotowano całkowite usunięcie produktów karmelizacji sacharozy dla pH = 8 dla obu stosowanych nośników. Po 0,5 h wraz z wydłużeniem czasu reakcji z nośnikiem zarówno dla GH, jak i PWA nie zanotowano zwiększenia stopnia usunięcia poszczególnych barwników wywaru, a wręcz przeciwnie – spadek stopnia usunięcia.



Rys. 3. Wpływ pH wywaru melasowego na zawartość produktów alkalicznego rozkładu inwertu (I), barwników melanoidynowych (M) oraz produktów karmelizacji sacharozy (K) po 0,5 h na złożu GH (a) oraz PWA (b)

Fig. 3. Effect of pH on the removal efficiency of invert alkaline degradation products (I), melanoidins (M) and caramels (K) after 0.5 h on HC (a) and PAC (b)

Na rysunku 4 przedstawiono wpływ dawki (g) zastosowanego złoża na efektywność dekoloryzacji wywaru o stężeniu 25%. W przypadku GH większa dawka złoża nie skutkowała zwiększeniem stopnia dekoloryzacji (rys. 4 a). W przypadku GH dawki złoża w ilości od 0,5 do 1,5 g na 100 cm³ wywaru pozwalały uzyskać największe odbarwienie, odpowiednio 93,2; 92 i 99% po 1 h reakcji z nośnikiem. Po 24 h reakcji nie odnotowano gwałtownego spadku stopnia dekoloryzacji, w przeciwieństwie do eksperymentów, w których badano wpływ pH na ten proces (rys. 2a i b). Zjawisko to potwierdza powinowactwo GH do niskich wartości pH, bliskich naturalnemu odczynowi wywaru melasowego. Gdy nośnikiem był PWA, najwyższy stopień dekoloryzacji odnotowano po 1 h sorpcji (98,7%), dla ilości złoża 2 g (rys. 4 b). Po 24 h sączenia wywaru na złożu PWA, gdy dawka była równa od 2,5 do 4 g, nastąpił wzrost stopnia dekoloryzacji wywaru powyżej 93%.



Rys. 4. Wpływ dawki złoża GH (a) oraz PWA (b) na stopień dekoloryzacji wywaru melasowego w czasie t = 0,5 h, 1 h oraz 24 h

Fig. 4. Effect of HC and PAC dose on the decolorization after 0.5 h, 1 h and 24 h

Ze względu na osiągnięcie wyższych wartości stopnia dekoloryzacji dla stosowanego węgla po 24 h reakcji z nośnikiem pominięto dane dotyczące glinki, a w tabeli 2 zamieszczono dane dotyczące stopni redukcji pola powierzchni oraz wysokości pików w chromatogramach wywaru melasowego po sorpcji tylko na złożu z węglem aktywnym.

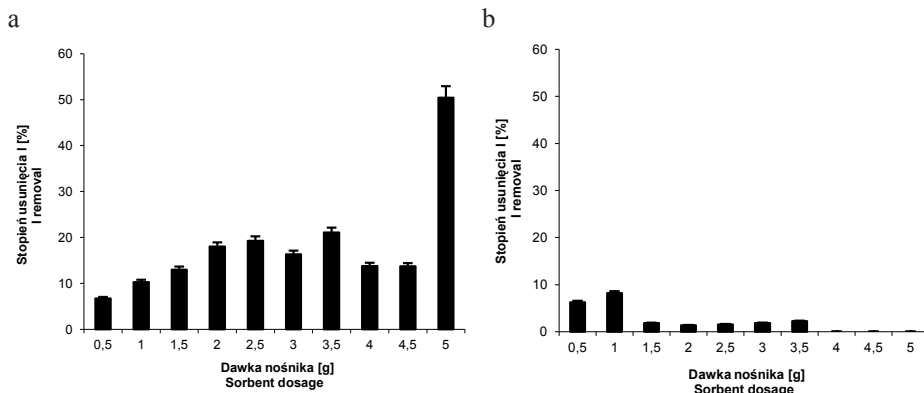
Tabela 2. Wpływ dawki PWA na stopień redukcji pola powierzchni oraz wysokości pików
Table 2. Effect of PAC dose on the extent of reduction in peak area and peak height (PAC)

PWA [g] PAC	Stopień redukcji [%] Removal	
	Pole powierzchni pików Peak area	Wysokość pików Peak height
	0,5	47
1	31	22
1,5	49	47
2	53	47
2,5	54	62
3	60	37
4	51	34
4,5	53	42
5	53	55

Dane zamieszczone w tabeli 2 pozwalają na potwierdzenie stopnia dekoloryzacji zmierzonego przez pomiar długości fali przy 475 nm (rys. 1 b). Najwyższy stopień redukcji pola powierzchni uzyskano dla dawki równej 3 g, zaś w najwyższym stopniu wysokość pików została pomniejszona, gdy ilość PWA wynosiła 2,5 g na 100 cm³ wywaru o stężeniu 25%. Dla tych dawek po 24 h reakcji wywaru ze złożem PWA stopień dekoloryzacji wywaru był wyższy niż 93%.

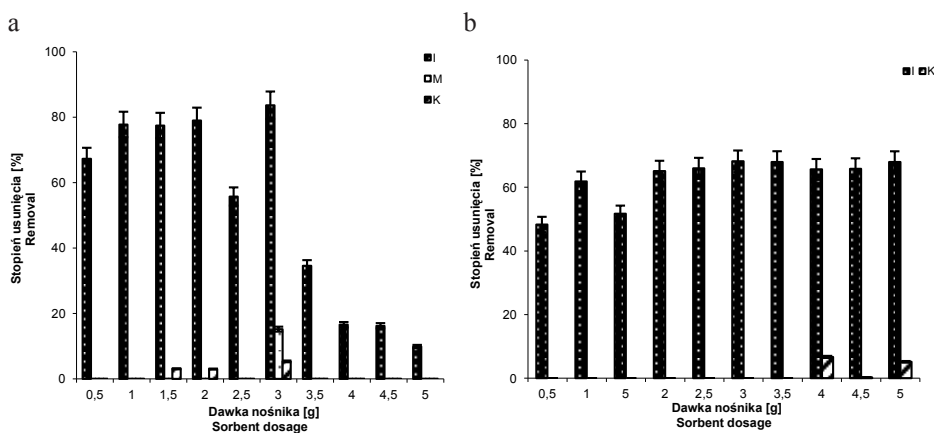
Analizując stopień usuwania poszczególnych barwników wywarowych na złożu GH, okazało się, że w przypadku GH usuwane były tylko produkty alkalicznego rozkładu inwertu. Najwyższy stopień usuwania tych związków (ponad 50%) zanotowano dla dawki 5 g glinki na 100 cm³ wywaru i czasu reakcji 0,5 h. Dla pozostałych dawek GH stopień usunięcia produktów alkalicznego rozkładu inwertu nie przekroczył 18,5% (rys. 5a). Po upływie 24 h stopień redukcji zawartości inwertu w porównaniu z tym osiągniętym po 0,5 h jeszcze zmalał. Najwyższy stopień redukcji inwertu, ponad 8%, odnotowano dla dawki 1 g GH na 100 cm³ wywaru (rys. 5 b).

Uzyskane wyniki wskazują na najskuteczniejsze usuwanie z roztworu produktów alkalicznego rozkładu inwertu (rys. 5 i 6). Po czasie filtracji 0,5 h maksymalna redukcja ich zawartości wyniosła 83% (3 g węgla aktywnego na 100 cm³ wywaru). Wraz ze zwiększeniem dawki PWA powyżej 3,5 g na 100 cm³ wywaru zmalał stopień usunięcia zawartości produktów alkalicznego rozkładu inwertu. Gdy czas reakcji wydłużono do 24 h, dla dawki od 2 do 5 g węgla aktywnego na 100 cm³ wywaru, stopień usunięcia inwertu był większy niż 65% (rys. 6b).



Rys. 5. Wpływ ilości nośnika GH na stopień redukcji produktów alkalicznego rozkładu inwertu (I) podczas sączenia wywaru melasowego w czasie 0,5 h (a) oraz 24 h (b)

Fig. 5. Effect of haloizyte clay (HC) resin dose on the removal of invert alkaline degradation products (I) after 0.5 h (a) and 24 h (b) reaction time



Rys 6. Wpływ dawki PWA na usuwanie z roztworu wywaru melasowego produktów alkalicznego rozkładu inwertu (I), barwników melanoidynowych (M) oraz produktów karmelizacji sacharozy (K), po upływie 0,5 h (a) i 24 h (b)

Fig. 6 Effect of PAC resin dose on the removal of invert alkaline degradation products (I), melanoidins (M) and caramels (K) after 0.5 h (a) and 24 h (b)

Maksymalny poziom usuwania melanoidynów (tylko 15%), podobnie jak w przypadku inwertu, odnotowano dla dawki 3 g węgla aktywnego na 100 cm³ wywaru po upływie 0,5 h od rozpoczęcia filtracji (rys. 6a). Brak lub niewielki stopień usuwania melanoidynów można tłumaczyć reakcjami zachodzącymi w roztworze pomiędzy produktami alkalicznego rozkładu inwertu a obecnymi w wywarze produktami rozkładu białek i amidów, skutkującymi powstawaniem znacznych ilości barwników melanoidynowych [Regiec 2010]. Stopień usunięcia zawartości barwników karmelowych obniżył się maksymalnie tylko o 5,3% (0,5 h, 3 g PWA) (Rys. 6a). Po upływie 24 h stopień usunięcia karmeli z wywaru niewiele się zmienił (nie był wyższy niż 7% dla dawki węgla aktywnego 4 i 5 g na 100 cm³ wywaru (rys. 6b).

Znacznie wyższy stopień dekoloryzacji uzyskany w doświadczeniach, gdy nośnikiem był węgiel aktywny, jest prawdopodobnie związany z wyższym stopniem usuwania produktów alkaicznego rozkładu inwertu z wywaru, które stanowiły ponad 81% wszystkich oznaczanych barwników w wywarze, w porównaniu z danymi uzyskanymi w eksperymentach, gdy stosowano jako nośnik glinę haloizytową. Ponieważ glina haloizytowa zawiera w swej strukturze chemicznej wiele reaktywnych pierwiastków, tj. glin, krzem, żelazo czy miedź, które reagując ze składnikami wywaru melasowego, prawdopodobnie dodatkowo powodowały powstawanie związków stanowiących inhibitory niekompetencyjne aktywnej sorpcji. Skutkowało to mniej efektywną dekoloryzacją wywaru z wykorzystaniem gliny haloizytowej w porównaniu z pylistym węglem aktywnym jako nośnikiem. Przyczyna leży w biochemicznych zależnościach i wysokiej reaktywności grup funkcyjnych barwników wywarowych.

PODSUMOWANIE

Najefektywniejsze odbarwienie wywaru melasy buraczanej odnotowano w 25% jego roztworze. Niezależnie od wartości pH najwyższy stopień dekoloryzacji wywaru melasowego odnotowano dla sorpcji na PWA. Po 24 h reakcji z nośnikiem stwierdzono preferencje złoża gliny haloizytowej do pH filtrowanych roztworów w zakresie pH 3–4 oraz 10–11. Wysoki stopień dekoloryzacji wywaru uzyskano w całym badanym zakresie pH w przypadku zastosowania węgla aktywnego. Względnie skuteczna dekoloryzacja zachodziła dla haloizytu w przypadku niższych dawek nośnika, dla węgla aktywnego wyższa dawka zapewniała wyższą efektywność dekoloryzacji wywaru. W największym stopniu zarówno podczas sorpcji na nośniku GH, jak i PWA usuwane były produkty alkaicznego rozkładu inwertu. Produkty karmelizacji sacharozy jak i barwniki melanoidynowe były usuwane słabo lub wcale bez względu na rodzaj stosowanego nośnika. Skuteczniejszym adsorbentem wydaje się być pylisty węgiel aktywny, a jego zastosowanie w dekoloryzacji może stanowić efektywne narzędzie w oczyszczaniu wywaru z melasy buraczanej.

PIŚMIENNICTWO

- Bharagava R.N., Chandra R., Rai V., 2009. Isolation and characterization of aerobic bacteria capable of the degradation of synthetic and natural melanoidins from distillery effluent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 737–744.
- Coca M., García M.T., González G., Peña M., García J.A., 2004. Study of coloured components formed in sugar beet processing. *Food Chem*, 86, 421–433.
- Joussein E., Petit S., Churchman J., Theng B., Righi D., Delvaux B., 2005. Halloysite clay minerals – a review. *Clay Minerals*, 40, 383.
- Krzywonos M., 2012. Decolorization of sugar beet distillery effluent using mixed cultures of bacteria of the genus *Bacillus*. *African Journal of Biotechnology*, accepted.
- Krzywonos M., Łapawa A., 2012. Decolourisation of sugar beet molasses vinasse by ion exchange. *CLEAN – Soil, Air, Water*, accepted.
- Krzywonos M., Seruga P., 2012. Decolorization of sugar beet molasses vinasse, a high-strength distillery wastewater, by lactic acid bacteria. *Polish Journal of Environmental Studies*, accepted.
- Lee S.Y., Kim S.J., Chung S.Y., Jeong C.H., 2004. Sorption of hydrophobic organic compounds onto organoclays. *Chemosphere*, 55, 781–785.

- Mane J.D., Modi S., Nagawade S., Phadnis S.P., Bhandari V.M., 2006. Treatment of spentwash using chemically modified bagasse and colour removal studies. *Bioresource Technology*, 97, 1752–1755.
- Pant D., Adholeya A., 2007. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review. *Bioresource Technology*, 98, 2321–2334.
- Regiec P., 2010. Zastosowanie nanofiltracji do zagęszczania soków cukrowniczych. UWP.
- Sapronov A.R., 1963. Kolichestvennoe opredelenie krasnyashchikh veshchestv v produktakh sahar-nogo proizvodstva (Quantitative determination of colourants in the sugar industry products). *Sacharnaja Promyslennost' SSSR*, 37, 32–35 (in Russian).
- Satyawali Y., Balakrishnan M., 2008. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: a review. *Journal of Environmental Management*, 86, 481–497.
- Shayegan J., Pazouki M., Afshari A., 2005. Continuous decolorization of anaerobically digested distillery wastewater. *Process Biochemistry*, 40, 1323–1329.
- Tessier F.J., 2009. The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathologie Biologie*, 58, 214–219.
- Zielnica J., Kumider J., Pacholek B., 2000. Odpady powstające podczas przetwarzania buraków cukrowych oraz kierunki ich wykorzystywania. *Ekopartner*, 2, 22–23.

HALOIZITE CLAY AND ACTIVATED CARBON – A SORBENTS FOR EFFICIENT DECOLORIZATION OF SUGAR BEET MOLASSES VINASSE

Abstract. Sugar beet molasses vinasse is a by-product of ethanol fermentation from sugar beet molasses. Its dark brown colour, which is attributable to the presence of caramels, melanoidins and invert alkaline degradation products, cannot be removed by biological methods. The aim of this work was to determine the efficiency of two adsorbents haloizite clay and powder activated carbon, when used for the decolourisation of sugar beet molasses vinasse. Optimal conditions and extent of decolourisation were related to the concentration and pH of the vinasse, the time of reaction with the resin, and also to the dose and type of the resin used.

Key words: sugar beet molasses vinasse, decolorization, powder activated carbon, haloizite clay

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2011

Do cytowania – For citation: Krzywonos M., Szymańska K., 2011. Glinka haloizytowa oraz węgiel aktywny jako potencjalne sorbenty w procesie skutecznego odbarwienia buraczanego wywaru melasowego. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (4), 5–16.

OKREŚLENIE DYNAMIKI FORMOWANIA BIOFILMU PRZEZ MIKROORGANIZMY ZŁOŻA METANOGENNEGO TECHNIKĄ MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ I CIEMNEGO POLA Z WYKORZYSTANIEM KOMPUTEROWEJ ANALIZY OBRAZU*

Dariusz Chudy¹, Sławomir Jabłoński¹, Marcin Łukaszewicz^{1,2}

¹ Uniwersytet Wrocławski

² Politechnika Wrocławska

Streszczenie. Większość znanych populacji mikroorganizmów wykształciła uzdolnienia adhezyjne prowadzące do wytwarzania biofilmu, będącego swoiście niepowtarzalnym mikroekosystemem. Badania koncentrowały się na dynamice adhezji i tworzeniu biofilmu w warunkach beztlenowych przez złoża metanogenne. Opracowano metodę umożliwiającą szacowanie liczby metanogennych archebakterii na podstawie technik mikroskopowych. Identyfikację metanogenów oparto na autofluorescencji koenzymów F_{420} i F_{430} . W przeprowadzonych eksperymentach powstawanie biofilmu badano na płytkach polistyrenowych, zanurzonych w beztlenowym reaktorze wypełnionym złożem fluidalnym. Badana płytka była częściowo zanurzona w złożu granulowanym, a częściowo w supernatancie nad złożem. Początkowo liczba komórek metanogenego biofilmu wynosiła $4,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ po 6 godz. kolonizacji, a następnie wzrosła do $1 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$ w 27 dobie kolonizacji. Biofilm zawierający więcej bakterii metanogennych szybciej powstawał w części płytki zanurzonej w supernatancie niż w tej części, która była zanurzona w złożu granulowanym. Przełomowym momentem w tworzeniu biofilmu była 21. doba, po której agregaty (mikrokolonie) znacznie się powiększały oraz zaczynała rosnąć ilość archebakterii metanogennych.

Słowa kluczowe: metanogenne złoża, biofilm, warunki beztlenowe, mikroskopia fluorescencyjna, F_{420} , F_{430} , polistyren

WSTĘP

Uzdolnienia adhezyjne mikroorganizmów wpływają m.in. na ochronę przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi. Umieszczone na wilgotnych powierzchniach stałych

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

* Praca była częściowo finansowana z grantów NCBiR KB/48/13639/IT1-B/U/08 oraz EU POIG.01.01.02-00-016/2008.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marcin Łukaszewicz, Wydział Biotechnologii, Zakład Biotransformacji, Uniwersytet Wrocławski, Przybyszewskiego 63-77, 51-148, Wrocław, e-mail: lukasz@biotrans.uni.wroc.pl

drobnoustroje tworzące trwałe, cienkie warstwy definiuje się jako biofilm [Bower i in. 1996]. Złożone wielokomórkowe heterogenne struktury otacza macierz (matrix), zbudowana z zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS, ang. extracellular polymeric substance). Dominującymi elementami EPS są: węglowodany, białka, lipidy, kwasy nukleinowe i różne nieokreślone heteropolimery, wpływające na wytrzymałość, elastyczność oraz zdolność biofilmów do adsorpcji [Orgaz i in. 2006].

Przyleganie znajdujących się w zawieszynie komórek planktonicznych do powierzchni jest warunkowane obecnością białek adhezyjnych (z ang. cell adhesion molecule (CAM)) oraz innych struktur białkowych, takich jak wici lub fimbrie. Osiedle komórki rozrastają się, tworząc mikrokolonie, a ich metabolizm ulega zmianie, w wyniku czego wytwarzane są proteoglikany spajające i ochraniające kolonie [Drenkard 2003]. Pomiędzy zespolonymi w macierzy mikrokoloniami, poprzez sieć kanalików, zachodzi transport składników pokarmowych i produktów przemiany materii, a także transmisja cząsteczek sygnałowych, związana z wydzielaniem autoinduktorów AIPs (ang. autoinducing polypeptides). Transfer ten umożliwia komunikowanie się komórek (tzw. quorum sensing), zmiany morfologiczne komórek i organizację struktury biofilmu [Hogan i in. 2004, Krasowska i in. 2009, Murzyn i in. 2010].

Pewne grupy mikroorganizmów rezydujących w formie biofilmu mogą być wykorzystywane w biotechnologii. Można zastosować je np. w procesach degradacji zanieczyszczeń w ściekach, biofiltracji lotnych związków organicznych (VOC's) czy produkcji różnego rodzaju związków chemicznych [Xie i in. 2009].

Od dziesiątek lat w centrum zainteresowania wielu badaczy są biofilmy powstające w warunkach beztlenowych z udziałem metanogennych archebakterii, mających kluczowe znaczenie w technologiach beztlenowego rozkładu ścieków czy w przetwarzaniu odpadów organicznych. Są one odpowiedzialne za końcowy etap konwersji materii organicznej, czyli redukcję jedno- i dwuwęglowych związków do metanu. Przedstawiciele *Euryarchaeota* cechuje naturalna zdolność do wytwarzania macierzy i rezydowania w biofilmie, występującym na powierzchniach stałych lub w zawieszynie w postaci granulek albo kłaczków (z ang. flocs) [Harvey i in. 1984]. Skład mikroflory i jej organizacja wewnątrz granulek odgrywają istotną rolę w konwersji substratu. Agregaty powstają wskutek adhezji metanogenów z bakteriami acetogennymi, produkującymi H_2 lub redukującymi siarczany. Centrum agregacji mogą stanowić same metanogeny albo nośniki abiotyczne. Takimi nośnikami mogą być faza stacjonarna (złoże nieruchome) bądź też faza mobilna (złoże fluidalne, zawiesinowe) [Silva i in. 2006].

Wiele beztlenowych technologii oczyszczania ścieków wykorzystuje w praktyce różnorodne reaktory wypełnione biofilmem. Czynnikiem decydującym o wysokiej efektywności usuwania zanieczyszczeń i produkcji metanu jest odpowiedni rozwój i utrzymanie biofilmu na powierzchni nośnika wypełniającego bioreaktor [Kuroda i in. 1988].

Biosynteza metanu u metanogennych archebakterii przebiega z udziałem unikatowych dla tej grupy mikroorganizmów, enzymów i grup prostetycznych. Przekazywanie elektronów z H_2 , redukujących związki jednowęglowe do metanu odbywa się za pośrednictwem koenzymu F_{420} . Forma utleniona tego koenzymu posiada maksimum absorpcji przy długości 420 nm i cechuje się niebiesko-zieloną fluorescencją [Cheeseman i in. 1972]. Końcowy etap powstawania metanu jest katalizowany przez metylo-reduktazę koenzymu M (MCR). Jej integralną częścią jest koenzym F_{430} , który ma miejsce aktywne w postaci niklowej tetrahydrokorpiny [Dey i in. 2006].

Celem pracy było badanie powstawania biofilmu zawierającego mikroorganizmy metanogenne z wykorzystaniem technik mikroskopii fluorescencyjnej i kontrastowo-fazowej oraz opracowanie zautomatyzowanej metody pozwalającej na zliczanie wszystkich komórek w ciemnym polu oraz metanogenów w mikroskopii fluorescencyjnej [Dodde-ma, Vogels 1978, Nettmann i in. 2010].

MATERIAŁY I METODY

Metanogenne złoże fluidalne

Doświadczenia adhezyjne prowadzono na metanogenym złożu fluidalnym, w którym mikroorganizmy tworzą autoagregaty w formie granulek o średnicy ok. 0,5–3 mm. Agregaty w ośrodku dyspergującym (supernatant, płyn hodowlany) tworzą koloid dwufazowy.

Izolacja oraz warunki amplifikacji fragmentów genu kodującego 16s rRNA metodą PCR

DNA izolowano za pomocą zestawu Ultra Clean™, Microbial DNA Isolation Kit firmy Mo Bio Laboratories, Inc. Region w obrębie 16s rRNA powielano za pomocą polimeraz *Taq* i pary primerów Bact27F (5' AGRGTTYGATYMTGGCTCAG 3') oraz Bact1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). Reakcję PCR (30 cykli) prowadzono w urządzeniu MJ Reaserch PLC-200 w następujących warunkach: denaturacja (1 min 94°C), hybrydyzacja (1 min 58,7°C dla Bact), elongacja (2 min 72°C). Produkt reakcji PCR poddano sekwencjonowaniu, następnie chromatogramy uzyskane z sekwencjonowania fragmentów DNA zostały poddane analizie i złożone programem DNA Baser v2 firmy HeracleSoftware. Tak uzyskane sekwencje porównano z sekwencjami nukleotydowymi zgromadzonymi w bazie NCBI za pomocą programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Badanie powstawania biofilmu na płytkach polistyrenowych zanurzonych w metanogenym złożu fluidalnym

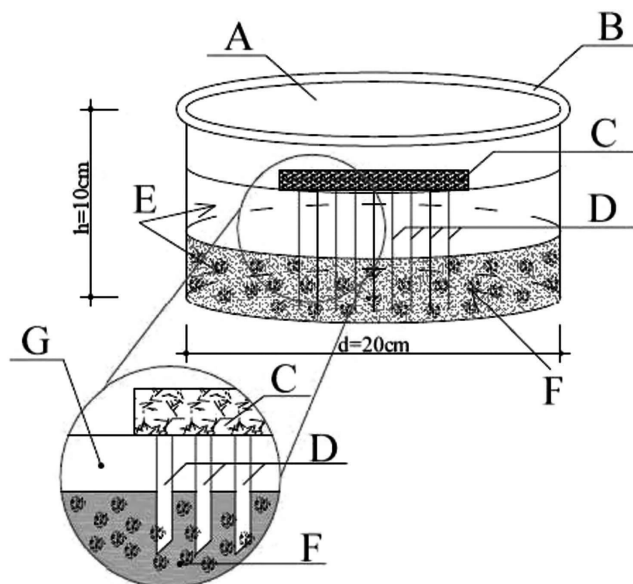
Płytki polistyrenowe (PS), (SARSTEDT) o wym.: 76 x 26 x 1 mm inkubowano w beztlenowym reaktorze o objętości 3 l, wypełnionym granulowanym złożem fluidalnym. Płytki PS zostały zakotwiczone w statywie ze spienionego polistyrenu i umieszczone w bioreaktorze. Objętość złoża w bioreaktorze (V_R) dobrano tak, aby dolna część płytki znajdowała się w fazie złoża (F), natomiast górna w fazie supernatantu (G) (rys. 1).

Bioreaktor umieszczono w cieplarni w temp. 36°C i dokarmiano pożywką co 24 h, utrzymując odczyn pH w zakresie 6,5–7,5. Pożywkę (V_0) stanowił roztwór: glukoza 10 g, mocznik 0,2 g, fosforan disodowy ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) 0,381 g, kwaśny węgiel sodu 2 g, na 1 l wody destylowanej. Stosunek masowy pożywki wynosił C : N : P = 600 : 15 : 5 [Weiland 2001].

Hydrauliczny czas aktywności (HRT) wynosił 7,5 doby.

$$HRT = \frac{V_R}{V_0}$$

gdzie objętość złoża (V_R) wynosiła 1 500 ml, objętość pożywki dodawanej co 24 h (V_0) – 200 ml, objętość fazy złoża (V_Z) – 500 ml; stosunek $V_R/V_Z = 3:1$.



Rys. 1. Schemat reaktora użytego do inkubacji: pokrywa (A), uszczelnienie pokrywy (B), tratwa ze spienionego polistyrenu (C), płytki PS (D), koloid dwufazowy (E), faza złoża granulowanego (F), faza supernatantu (G)

Fig. 1. Scheme of the incubation reactor: cover (A), seal of the lid (B), foamed polystyrene (C), PS plates (D), two-phase colloid (E), granulated sludge (F), supernatant phase (G)

Obserwacje adhezujących mikroorganizmów i powstającego biofilmu wykonywano od 6 godziny do 40 doby eksperymentu (rys. 2).

Mikroskopia fluorescencyjna i ciemnego pola

Do obserwacji preparatów przyżyciowych wykonywanych na płytkach PS po inkubacji używano mikroskopu fluorescencyjnego „Axio Imager A2”, (CARL ZEISS). Mikroskop wyposażony był w krótkoświetlową lampę rtęciową HBO 100 (OSRAM) o mocy 100 W i maksymalnym strumieniu świetlnym 2200 lm, z automatycznie centrującym się palnikiem.

Główne parametry techniczne w konfiguracji do obserwacji we fluorescencji i ciemnym polu:

- Filtr HE (High Efficiency) o wąskim zakresie wzbudzenia, 395–440 nm oraz szerokim zakresie emisji, 470–800 nm.
- Immersyjny obiektyw klasy IC²S (Infinity Color & Contrast Corrected), N-Achroplan 100x/1,25 z przesłoną irysową do obserwacji w ciemnym polu i fluorescencji.
- Achromatyczny, aplanatyczny kondensator z immersyjną soczewką czołową, Nr 424208 (CARL ZEISS).
- Aparat fotograficzny Canon PowerShot G10, z matrycą CCD 1.7” z 14,7 milionami efektywnych pikseli o maksymalnej rozdzielczości 4416x3312, sterowany zdalnie oprogramowaniem AxioVision Release 4.8.2.0.

Sporządzanie preparatów mikroskopowych

Preparaty przyżyciowe sporządzano na płytkach PS po zadanych czasach inkubacji. Każdą z płytek po wyjęciu z pojemnika przenoszono do zlewki (150 ml) z wodą destylowaną, niedopuszczając do ich wyschnięcia. Następnie z jednej ze stron płytki lub krążka usuwano biofilm bibułą nasączoną 96% etanolem. Drugą stronę spłukiwano intensywnym, jednostajnym strumieniem wody destylowanej, kierowanym z tryskawki z odległości ok. 8 cm. Strumień przesuwano „zygzakiem” pomiędzy krawędziami, począwszy od górnej części płytki (sekcja FS) do dolnej (sekcja FZ). Czynność powtarzano kilkakrotnie do odmycia widocznych zanieczyszczeń i delikatnie osuszano krawędzie płytki/krążka, pozostawiając cienką warstwę wody na powierzchni preparatu. Następnie na każdym sporządzanym preparacie umieszczano po dwa szkiełka nakrywkowe. Krawędzie szkiełek nakrywkowych pokrywano cienką warstwą lakieru, niedopuszczając tym samym do wysychania preparatu. Po wyschnięciu lakieru preparaty poddawano obserwacjom mikroskopowym.

Obserwacje mikroskopowe

Przygotowywane preparaty analizowano mikroskopowo. Przed przystąpieniem do obserwacji centrowano kondensator mikroskopu metodą wg Köhlera. Po otrzymaniu obrazu w pierwszym punkcie odniesienia wykonywano po dwie fotografie (ciemne pole/fluorescencja). Następnie przesuwano preparat na stoliku mikroskopu o 1,5 mm w osi X, koordynaty stolika, do kolejnego punktu. Dla każdego z preparatów wyznaczano dwa rzędy punktów (po 5 przesuniętych w osi X i kolejnych 5 równoległych do osi X, z przesunięciem 1 cm w osi Y). W celu jak najwierniejszego odwzorowania średniego zagęszczenia biofilmu na całej płytce każdy preparat analizowano, stosując te same przesunięcia.

Cyfrowe przetwarzanie obrazu

Uzyskane obrazy, w zalecanej przez producenta rozdzielczości 1230x960 (24 bit RGB color) dla obiektywu N-Achroplan 100x/1,25, przed zachowaniem poddawano przetworzeniu. W celu wzmocnienia sygnału w zakresie 0–255 dla obrazu kolorowego wykorzystano narzędzia aplikacji AxioVision. Zastosowano funkcje „najlepszego dostosowania” (best fit) dla obrazów uzyskanych we fluorescencji oraz funkcję zawężającą (Min/Max) dla obrazów w ciemnym polu. W przypadku obrazów w ciemnym polu zwiększano wartość gamma do 2,3–2,7 (w zależności od jakości uzyskanego obrazu). Następnie obrazy zapisywano bez kompresji w formacie *.zvi (Axio Vision Image) .

Szacowanie liczby komórek i stopnia pokrycia powierzchni płytek

Do szacowania liczby komórek/poligonów użyto modułu do automatycznych pomiarów aplikacji AxioVision.

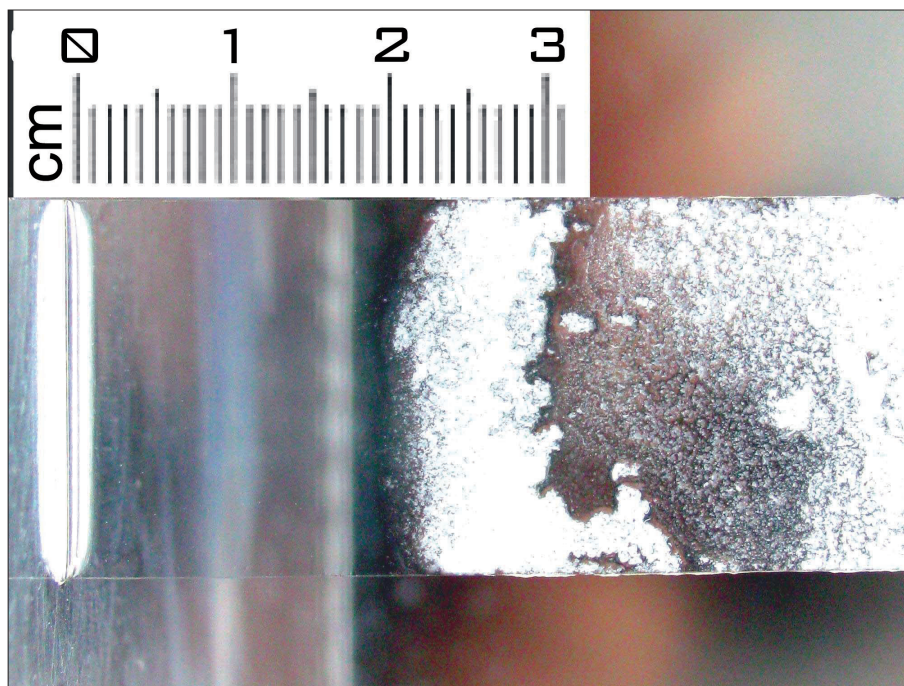
WYNIKI I DYSKUSJA

Do obserwacji tworzenia biofilmu zawierającego mikroorganizmy metanogenne wykonano bioreaktory wypełnione granulowanym złożem metanogennym. Populację granuliek stanowią zespoły mikroorganizmów (grupy odpowiedzialne za poszczególne etapy procesu, tworzące układy symbiotyczne). Badania przeprowadzone w Zakładzie Bio-

transformacji wykazały na podstawie sekwencji 16S rRNA, że poza mikroorganizmami metanogennymi w skład mikroflory złoża wchodziły również: *Bacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Delftia sp.*, *Comamonas sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Trichococcus sp.*, *Nostocoida sp.*

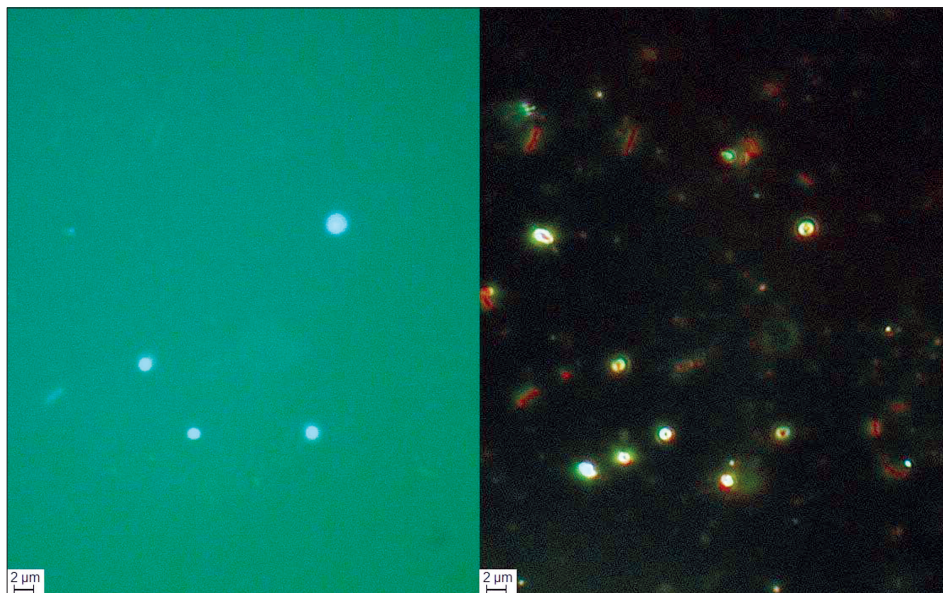
Wstępne testy z płytkami z różnych materiałów (szkło, polipropylen i polistyren) pokazały, że biofilm najszybciej powstaje na powierzchni polimerów syntetycznych, zwłaszcza hydrofobowego polistyrenu.

Obserwacje prowadzono po: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 h oraz po 5, 6, 7, 8, 10, 15, 21, 24, 27, 28, 33, 40 dobie (fot. 2 i 3). Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach w trzylitrowym bioreaktorze, zasilając złoża fluidalne pożywką z glukozą. W opracowaniu statystycznym zestawiono m.in. zmianę wielkości identyfikowanych na obrazach mikroskopowych obszarów (poligonów) widocznych w ciemnym polu oraz ilość widocznych we fluorescencji komórek (metanogeny). Ilość poligonów w całym zakresie wielkości identyfikowanych obiektów malała w czasie. Taki trend jest wynikiem stopniowego zanikania w czasie inkubacji najbardziej licznej frakcji pojedynczych komórek wraz ze wzrostem ilości poligonów złożonych z wielu komórek. Zaobserwowano również, że liczba poligonów w sekcji płytki zanurzonej w fazie supernatantu jest przeważnie wyższa niż w sekcji inkubowanej w fazie złoża, co sugerowały obserwacje makroskopowe (fot. 1).

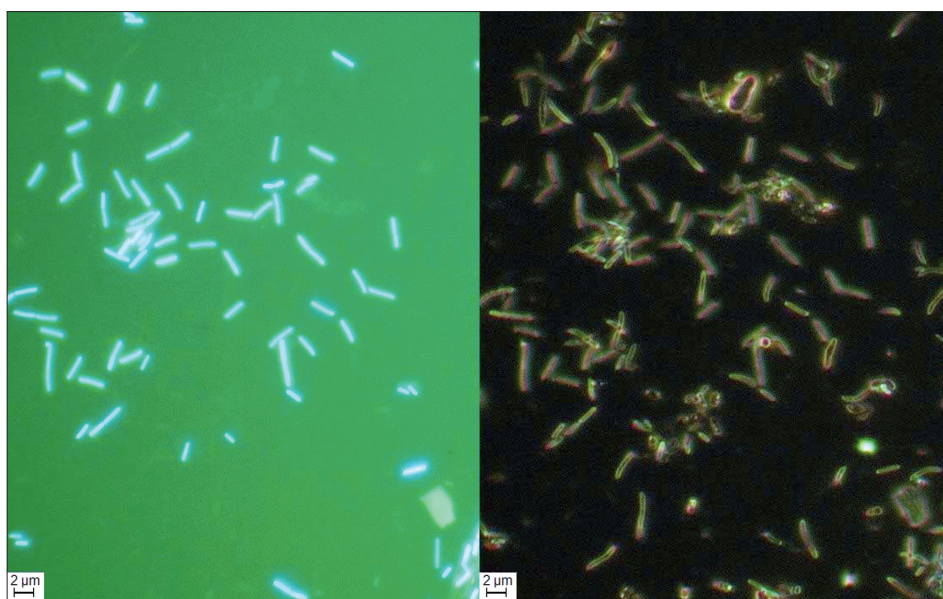


Fot. 1. Płytką po 60 dobach inkubacji jest wyraźnie pokryta biofilmem tylko w strefie inkubowanej w obrębie supernatantu

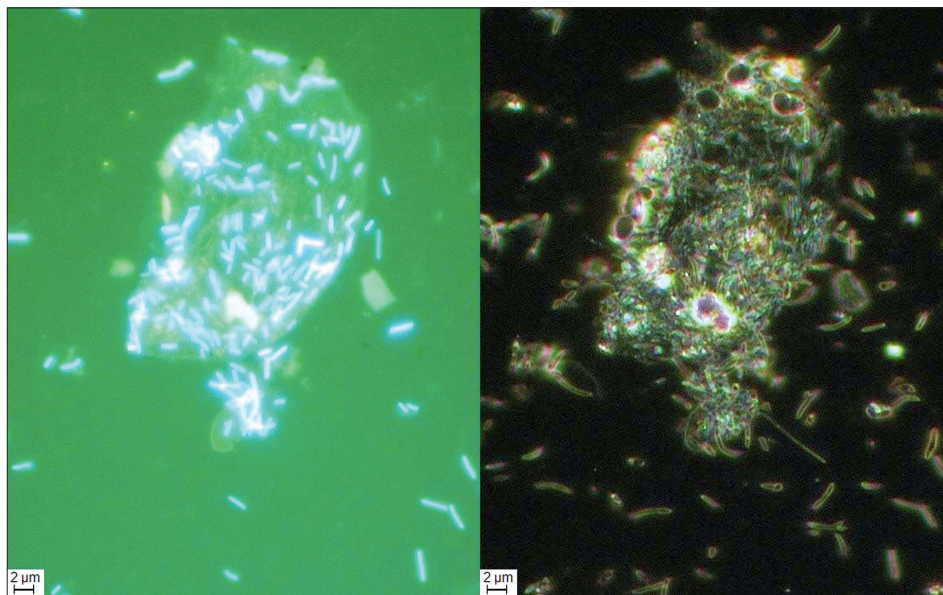
Phot. 1. Plate after 60 days of incubation is clearly coverage with biofilm, but only within the zone incubated in supernatant



Fot. 2. Obraz po 72 godzinie inkubacji
Phot. 2. Image after 72 hour of incubation



Fot. 3. Zespól pojedynczych komórek o intensywnej fluorescencji (33. doba inkubacji)
Phot. 3. The complex of singular cells with intense fluorescence (33 day incubation)



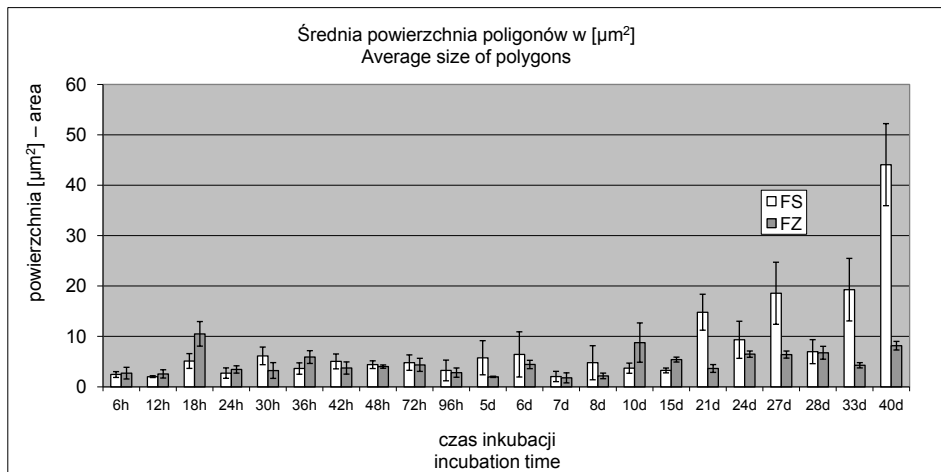
Fot. 4. Agregaty obserwowalne po 21. dobie inkubacji
 Phot. 4. The aggregates observed after 21 day of incubation

Średnia powierzchnia poligonów rośnie w czasie (rys. 2). Najbardziej wyraźny wzrost wielkości identyfikowanych obiektów ma miejsce w 21. dobie inkubacji w sekcji płytki zanurzonej w fazie supernatantu. W sekcji płytki zanurzonej w fazie złoża przez cały czas trwania eksperymentu średnia wielkość poligonów oscylowała poniżej $10 \mu\text{m}^2$. Do 21. doby nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między średnimi wielkościami poligonów zaobserwowanych w sekcji płytki zanurzonej w fazie supernatantu a sekcją płytki zanurzonej w fazie złoża. Po 21. dobie inkubacji istotnie wzrosła średnia powierzchnia poligonów oraz ilości komórek fluoryzujących (zawierających koenzym F_{420} , F_{430}) (rys. 3).

Liczba komórek metanogennych rosła skokowo i była ściśle powiązana ze wzrostem średniej wielkości poligonów, a co za tym idzie, zwiększeniem udziału frakcji agregatów w biofilmie. Z ilości i wielkości poligonów wynika, że przełomowy moment następuje około 21. doby. Po pojawieniu się frakcji agregatów gwałtownie zaczyna rosnąć ilość metanogenów. Pomiedzy częściami inkubowanymi w fazie supernatantu i w fazie złoża zaobserwowano istotną różnicę zarówno jeżeli chodzi o średnią wielkość identyfikowanych poligonów, jak i ilość metanogenów.

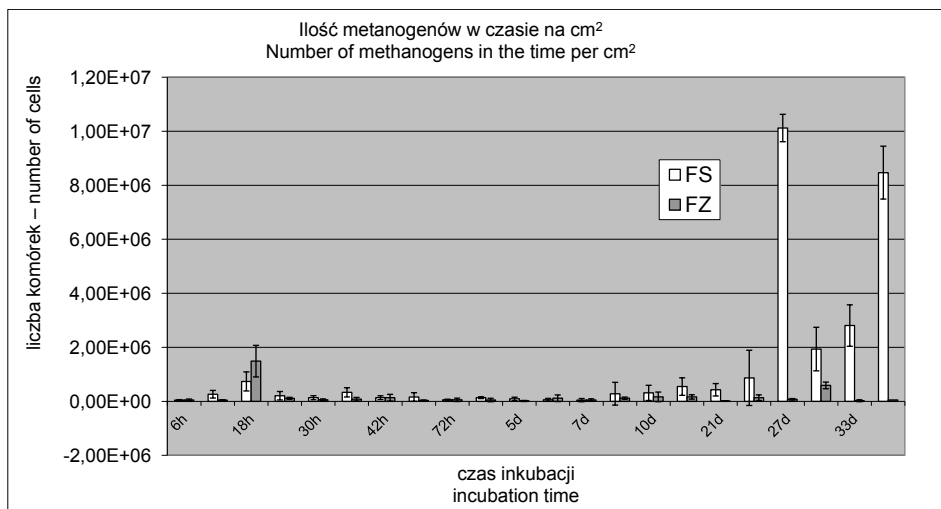
Biofilm szybciej i intensywniej formował się na powierzchniach znajdujących się w supernatancie. Może to być powodowane transmisją autoinduktorów z granulek złoża. Po 27. dobie zaobserwowano na powierzchni płytki ponad $1 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$ poligonów odpowiadających wielkością pojedynczym komórkom. Po tym samym czasie we fluorescencji, zaobserwowano najintensywniejszy przyrost liczby komórek metanogennych.

Jednak do bardziej precyzyjnego zobrazowania procentowego udziału populacji archebakterii należałoby posłużyć się analizą 16S rRNA, np. metodą według [Habouzit i in. 2011].



Rys. 2. Średnia wielkość poligonów obserwowana w fazie supernatantu oraz w fazie złoża. Słupki błędów pokazują \pm przedział ufności (dla $\alpha = 0,05$)

Fig. 2. Average size of polygons in the supernatant phase and the phase of the granulated sludge. Error columns shows \pm confidence interval (for $\alpha = 0.05$)



Rys. 3. Występowanie komórek zawierających koenzym F420 w biofilmie podczas trwania eksperymentu. Słupki błędów pokazują odchylenie standardowe

Fig. 3. Occurrence of the coenzyme F420 containing cells in the biofilm during the experiment. Error bars show the standard deviation

Najwyraźniej widoczny jest spadek liczebności frakcji pojedynczych komórek niezależnie od usytuowania na części płytki. Jednak tylko w fazie supernatantu zauważalny jest wzrost frakcji agregatów w czasie hodowli. Ten fakt można tłumaczyć zdolnością porozumiewania się (*quorum sensing*), umożliwiającą „wyczuwanie” zagęszczenia.

PODSUMOWANIE

1. W wyniku przeprowadzonych badań opracowane zostało stanowisko do badania tworzenia biofilmu w warunkach beztlenowych.

2. Opracowano metodę umożliwiającą zautomatyzowane zliczanie wszystkich adhezowanych komórek na ciemnym polu oraz metanogenów we fluorescencji.

3. Stwierdzono, że formowanie biofilmu przez złożę metanogenne w warunkach beztlenowych było procesem długotrwałym, a ilość metanogennych archebakterii zaczynała rosnąć po 21. dobie.

4. W obrębie złoża granulowanego zachodzi prawdopodobnie zjawisko *quorum sensing*. Dojrzały biofilm nie powstawał na części płytki inkubowanej bezpośrednio w fazie złoża.

5. Ilość metanogennych archebakterii istotnie się zwiększała tylko w części płytki polistyrenowej zanurzonej w fazie supernatantu.

PIŚMIENNICTWO

- Bower C.K., McGuire J., Daeschel M.A., 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science & Technology*, 7 (5), 152–157.
- Cheeseman P., Toms-Wood A., Wolfe R.S., 1972. Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420, from *Methanobacterium* strain M.o.H. *J Bacteriol*, 112 (1), 527–531.
- Dey M., Kunz R.C., Van Heuvelen K.M., Craft J.L., Horng Y.C., Tang Q., Bocian D.F., George S.J., Brunold T.C., Ragsdale S.W., 2006. Spectroscopic and computational studies of reduction of the metal versus the tetrapyrrole ring of coenzyme F430 from methyl-coenzyme M reductase. *Biochemistry*, 45 (39), 11915–11933.
- Doddema H.J., Vogels G.D., 1978. Improved identification of methanogenic bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol.*, 36 (5), 752–754.
- Drenkard E., 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*, 5(13), 1213–1219.
- Habouzit F., Gévaudan G., Hamelin J., Steyer J.-P., Bernet N., 2011. Influence of support material properties on the potential selection of Archaea during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource Technology*, 102 (5), 4054–4060.
- Harvey M., Forsberg C.W., Beveridge T.J., Pos J., Ogilvie J.R., 1984. Methanogenic activity and structural characteristics of the microbial biofilm on a needle-punched polyester support. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48 (3), 633–638.
- Hogan D.A., Vik A., Kolter R., 2004. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol. Microbiol.*, 54 (5), 1212–1223.
- Krasowska A., Murzyn A., Dyjankiewicz A., Łukaszewicz M., Dziadkowiec D., 2009. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Research*, 9 (8), 1312–1321.
- Kuroda M., Yuzawa M., Sakakibara Y., Okamura M., 1988. Methanogenic bacteria adhered to solid supports. *Water Research*, 22 (5), 653–656.
- Murzyn A., Krasowska A., Stefanowicz P., Dziadkowiec D., Łukaszewicz M., 2010. Capric Acid Secreted by *S. boulardii* Inhibits *C. albicans* Filamentous Growth, Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS ONE* 5 (8): e12050.
- Nettmann E., Bergmann I., Pramschufel S., Mundt K., Plogsties V., Herrmann C., Klocke M., 2010. Polyphasic Analyses of Methanogenic Archaeal Communities in Agricultural Biogas Plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (8), 2540–2548.

- Orgaz B., Kives J., Pedregosa A.M., Monistrol I.F., Laborda F., SanJosé C., 2006. Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (1), 51–56.
- Silva A.J., Hirasawa J.S., Varesche M.B., Foresti E., Zaiat M., 2006. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe* 12 (2), 93–98.
- Weiland P., 2001. *Grundlagen der Methangärung–Biologie der Substrate.*, VDI-Verlag.
- Xie B., Liang S.B., Tang Y., Mi W.X., Xu Y., 2009. Petrochemical wastewater odor treatment by biofiltration. *Bioresour Technol.*, 100 (7), 2204–2209.

DETERMINATION THE DYNAMICS OF BIOFILM FORMATION BY MICROORGANISMS THE METHANOGENIC CONSORTIUM, BY THE FLUORESCENCE MICROSCOPY AND DARK FIELD TECHNIQUE, USING COMPUTER IMAGE ANALYSIS

Abstract. Most of known populations of microorganisms evolved adhesive abilities leading to a biofilm formation which is a unique microecosystem. This study is focused on dynamic of adhesion and biofilm formation in anaerobic conditions by the methanogenic consortium. Within this work the microscopic method enabling estimation of the number of the methanogenic *Archaea* has been developed. Identification of methanogenes was based on autofluorescence of F_{420} and F_{430} coenzymes. Initially, the number of cells in methanogenic biofilm, was $4,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ (at 6 h colonization), then increased to $1 \times 10^7 \text{ cm}^{-2}$ (on day 27 of colonization). Biofilm formation was faster on the plate section within the supernatant. The crucial point in biofilm formation was around 21 day, after which aggregates (microcolonies) were significantly increasing and fluorescent methanogens accumulated.

Key words: methanogenic consortium, biofilm, anaerobic conditions, fluorescence microscopy, F_{420} , F_{430} , polystyrene

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2011

Do cytowania – For citation: Chudy D., Jabłoński S., Łukaszewicz M., 2011. Określenie dynamiki formowania biofilmu przez mikroorganizmy złoża metanogenego techniką mikroskopii fluorescencyjnej i ciemnego pola z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (4), 17–28.

DROŹDŹE *YARROWIA LIPOLYTICA* W BIODEGRADACJI SUBSTANCJI TŁUSZCZOWYCH ZAOLEJONEJ ZIEMI BIELĄCEJ

Teresa Krzyśko-Łupicka¹, Małgorzata Robak²

¹ Uniwersytet Opolski

² Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W pracy badano uzdolnienia drożdży *Yarrowia lipolytica* do biodegradacji substancji tłuszczowych w ZZB (Zaolejona Ziemia Bieląca). W badaniach stosowano inokulum drożdży o zróżnicowanej liczbie jednostek propagacyjnych, w postaci wolnej biomasy oraz unieruchomionej w formie granulek alginianowych. Aktywność zróżnicowanych form szczepionki oraz kierunki rozkładu substancji tłuszczowej w ZZB określono na podstawie analizy mikrobiologicznej, chemicznej oraz oznaczenia trwałości granulek po zakopaniu prób w ziemi na okres zimy. Imobilizowana szczepionka *Y. lipolytica* stymulowała wzrost bakterii autochtonicznych i grzybów. Najwyższy ubytek substancji tłuszczowej w porównaniu z kontrolą obserwowano w obecności 50% granulek w ZZB. Natomiast niezależnie od typu szczepionki tendencje rozkładu substancji tłuszczowych były zbliżone, ale odmienne od procesów samorzutnych. Efektem przemian stymulowanych zarówno biomasą, jak i drożdżami imobilizowanymi było obniżenie zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych o długości łańcucha C6 – C8, a wzrost C9, C16-C18. Wynika stąd, że wykorzystując szczepionki można ukierunkować proces biokonwersji substancji tłuszczowych w ZZB do kwasów tłuszczowych o dłuższym łańcuchu. Warto podkreślić, że proces bioremediacji zachodził nawet w okresie zimy.

Słowa kluczowe: Zaolejona Ziemia Bieląca, imobilizowana biomasa, *Yarrowia lipolytica*, bioremediacja

WSTĘP

Zaolejona Ziemia Bieląca (ZZB) powstająca jako odpad w procesie rafinacji tłuszczów zawiera do 40% oleju [Kumider 1996, Lara, Park 2003]. W Polsce zawartość olejów wynosi od 18–30%, w tym głównie są to nienasycone kwasy tłuszczowe, makro- i mikroelementy, barwniki roślinne, śluzu, związki siarki i metale. Są to odpady trudne do

Adres do korespondencji – Corresponding autor: Teresa Krzyśko-Łupicka, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. Kominka 6a, 45-035 Opole, teresak@uni.opole.pl

utylicacji ze względu na zróżnicowany skład oraz nieprzepuszczalność wody i powietrza, ale pozostawienie ich na wysypiskach jest niedopuszczalne ze względów ekologicznych. Dotychczas nie udało się opracować opłacalnej metody, umożliwiającej ponowne wykorzystanie ZZB w procesie rafinacji tłuszczu, albowiem po jednorazowym zastosowaniu jej aktywność silnie maleje i usunięcie oleju oraz zanieczyszczeń wymaga użycia dużych ilości rozpuszczalników. Dotychczasowe badania z zakresu oczyszczania i zagospodarowywania ZZB, odpadu poekstrakcyjnego koncentrują się na opracowaniu szczepionek (biopreparatów) przyspieszających rozkład substancji tłuszczowych. Prowadzone są również prace nad rozkładem ZZB w procesie kompostowania z dodatkiem osadu czynnego i słomy [Piotrowska-Cyplik 2011].

Mikroorganizmami o szerokiej aktywności biodegradacyjnej są drożdże należące do gatunku *Yarrowia lipolytica*. Wykorzystywane są one w postaci zawiesiny komórek, płynnej biomasy lub unieruchomionej (immobilizowane) w bioremediacji gleby zanieczyszczonej węglowodorami [Robak 2006, Robak i in. 2011, Żogała i in. 2005], ukorzenianiu i rozwoju roślin [Vassilev i in. 2001] oraz w rozkładzie substancji tłuszczowych [Concalves i in. 2009, Krzyśko-Lupicka 2009]. Drożdże *Y. lipolytica* to szczep niepatogeniczny dla człowieka [Yoshida, Hashimoto 1986], o dużych uzdolnieniach enzymatycznych, dzięki czemu może być wykorzystany do produkcji biopreparatów. Wydaje się, że efektywność ich działania zależna jest od formy użytkowej, dotyczy to zwłaszcza technologii remediacji opartej na inokulantach [Kowalczyk i in. 2009]. Ponadto procesy bioremediacji wymagają dłuższego okresu działania, często zahaczającego o okres zimy, w którym zahamowany jest rozwój i metabolizm drobnoustrojów, a nawet dochodzi do trwałej inaktywacji szczepionki. Chociaż znane są procesy oczyszczania środowiska w niskich temperaturach zachodzące z udziałem drobnoustrojów [Margesin 2000].

CEL PRACY

Celem pracy było określenie kierunku przemian substancji tłuszczowych w Zaolejonej Ziemi Bielącej (ZZB) w obecności wolnej i immobilizowanej biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* o zróżnicowanej liczbie jednostek propagacyjnych w warunkach naturalnie panujących w okresie zimy.

Niniejszej praca jest kontynuacją badań nad aktywnością drożdży *Y. lipolytica* w biodegradacji substancji tłuszczowych. Aktywności zastosowanych szczepionek określono na podstawie zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w ZZB przed i po procesie.

MATERIAŁY I METODY

Material badań. Badane próby ZZB ze szczepionkami (w specjalnych pojemniczkach) zakopano 31 października 2005 r. do 25 marca 2006 r. w ziemi na głębokości około 50–60 cm. Po okresie zimy wykonano analizę mikrobiologiczną i chemiczną badanych próbek.

ZZB – odpad porafinacyjny z Nadodrzańskich Zakładów Tłuszczowych w Brzegu, pobrany bezpośrednio po zakończeniu procesu rafinacji. Głównymi składnikami ekstraktu tłuszczowego z ZZB były kwasy osiemnastowęglowe (27,14 g·100 g⁻¹sm) i kwas cyklopentaundekanowy (1,13 g·100 g⁻¹ s m).

Do badań wykorzystano szczep drożdży *Y. lipolytica* A-101 pochodzący z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Zapas kultury przechowywano na skosie YM w 4°C. Hodowlę prowadzono w bioreaktorze AK 210 (VneshTechnika, Moscow) w temp. 28°C, przy stałym pH 5,5 (dozowanie NaOH) i napowietrzaniu 1,2 dm³·min⁻¹, przez 48 godz. [Kowalczyk i in. 2009].

W badaniach stosowano inoculum drożdży *Y. lipolytica* w postaci wolnej biomasy – o gęstości inoculum 1,20·10¹² jtk·dm⁻³ oraz unieruchomionej biomasy w alginianie sodu w formie granulek o gęstość inoculum 1,70·10⁹ jtk·dm⁻³ w układach przedstawionych w tabeli 1.

Tabela 1. Próby doświadczalne

Table 1. Investigated samples

Próby – Samples	Skład próby – Sample composition
Kontrola – Control	100 ml ZZB/SBE
Granulki – Beads	50 ml ZZB + 50 ml granulek – beads
	75 ml ZZB + 25 ml granulek – beads
	80 ml ZZB + 20 ml granulek – beads
	90 ml ZZB + 10 ml granulek – beads
Płynna biomasa – Biomass suspension	50 ml ZZB + 50 ml płynnej biomasy – biomass suspension
	80 ml ZZB + 20 ml płynnej biomasy – biomass suspension
	90 ml ZZB + 10 ml płynnej biomasy – biomass suspension

METODY BADAŃ

Badania obejmowały: oznaczenie mas ekstraktów tłuszczowych próbek ZZB oraz pH, analizę jakościową i ilościową ekstraktów tłuszczowych z ZZB, oznaczenie trwałości granulek, aktywności drożdży immobilizowanych po procesie oraz analizę mikrobiologiczną.

Oznaczenie zawartości ekstraktów tłuszczowych próbek ZZB oraz pH. Do oceny kwasowości próbek pobierano po 10 g ZZB, zawieszano w 25 cm³ 0,2-molowego roztworu KCl i mierzono pH [Ostrowska i in. 1991]. Efektywność ubytku tłuszczu oznaczono poprzez pomiar zawartości ekstraktu tłuszczowego w 1 g s.m. ZZB metodą ekstrakcyjno-wagową. Naważki badanych próbek (5 g s.m.) ekstrahowano chloroformem w aparatach Soxhleta, a następnie roztwór zateżano przez odparowanie rozpuszczalnika w wyparce próżniowej i ważono pozostałość. Wyniki podano w g ekstraktu tłuszczowego·g⁻¹ s.m. badanej próbki [Krzyśko-Lupicka 2009].

Analiza jakościowa i ilościowa ekstraktów tłuszczowych z ZZB. Skład ilościowo-jakościowy ekstraktów tłuszczowych badano metodą GC/MS z zastosowaniem aparatu firmy Hewlett-Packard model 5890/II, w następujących warunkach Kolumna FFAP, temp. dozownika 40°C, gradient temp. 10°C·min⁻¹ do 220°C, grzanie izotermiczne 20 min (40/10/220-20), temp. detektora 220°C, gaz nośny hel – 2 cm³·min⁻¹. Próbkę dozowano metodą *on column*. Do identyfikacji produktów rozkładu tłuszczu oraz oznaczenia ich ilościowego udziału w ekstrakcie użyto programu HP Analytical NIST MS Search Programm and Spectra Database. Skład ilościowy substancji tłuszczowej podano w g·100 g⁻¹ s. m. ZZB.

Oznaczenie trwałości granulek oraz aktywności drożdży immobilizowanych. Próbkę gleby po wykopaniu z terenu poddano analizie makroskopowej, sensorycznej (zapach konsystencja) oraz sprawdzono aktywność drożdży unieruchomionych w granulach alginianowych i zbadano ich twardość [Kowalczyk i in. 2009].

Analiza mikrobiologiczna. Liczebność drobnoustrojów obecnych w badanych próbkach ZZB określano metodą hodowli na szalkach Petriego. Ogólną liczbę bakterii oznaczono w podłożu o składzie [g·dm⁻³]: agar wzbogacony – 25, glukoza – 10, agar – 10, natomiast ogólną liczbę drożdży i pleśni oznaczono w podłożu agarowym z oksytetracykliną o składzie [g·dm⁻³]: YE – 5 glukoza – 10, agar – 20, oksytetracyklina – 0,1. Część wyników dotyczących analizy mikrobiologicznej opublikowano w 2009 r. [Kowalczyk i in. 2009].

WYNIKI

Szczepionki wprowadzone do ZZB różniły się zarówno formą, jak i liczebnością komórek drożdży, w związku z tym potraktowano je jako odrębne biopreparaty, oceniając ich wpływ na kierunek przemian substancji tłuszczowej oraz skład mikroflory.

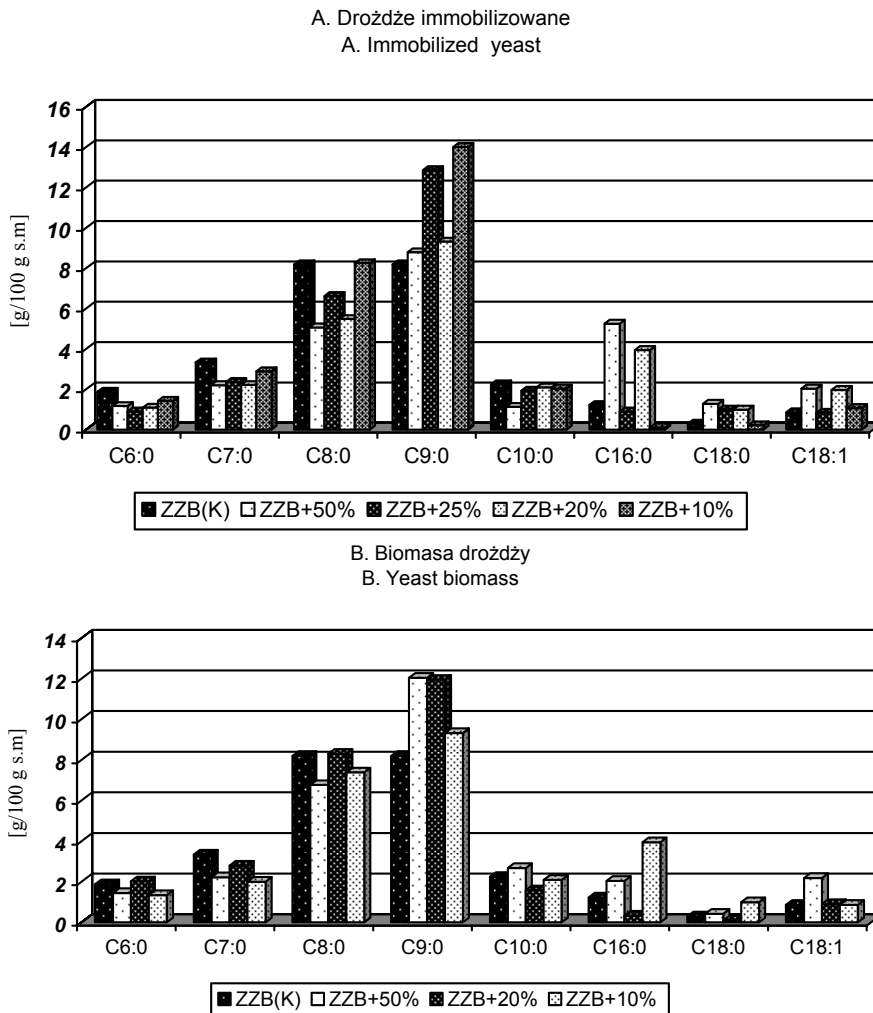
Dawka wprowadzanej szczepionki drożdży miała wpływ na odczyn oraz zawartość ekstraktu tłuszczowego i skład kwasów tłuszczowych w badanych próbkach ZZB. W obecności szczepionki, w porównaniu z kontrolą (którą stanowiła ZZB podlegająca samorzutnym przemianom, zachodzącym w tych samych warunkach), obserwowano nieznaczny wzrost pH. Jego wartość wahała się od 3.30–3.70 w zależności od dawki (tab. 2). Najwyższe pH (3,7 i 3,5) obserwowano odpowiednio po zastosowaniu 25% dodatku granulek i 20% dodatku płynnej biomasy do ZZB.

Tabela 2. Zawartość ekstraktu tłuszczowego oraz pH próbek ZZB

Table 2. The content of fatty extracts and pH of SBE samples

Gleba Soil	pH _{KCl}	Zawartość ekstraktu tłuszczowego [g·100 g ⁻¹ s. m.] Fatty extract content
Kontrola (ZZB) – 100 ml – Control (ZZB) – 100 ml	3,15	35,54
50 ml ZZB + 50 ml granulek – beads	3,50	29,11
75 ml + 25 ml granulek – beads	3,70	32,01
80 ml + 20 ml granulek – beads	3,30	32,08
90 ml + 10 ml granulek – beads	3,50	33,56
50 ml + 50 ml płynnej biomasy – biomass suspension	3,30	33,82
80 ml + 20 ml płynnej biomasy – biomass suspension	3,40	31,10
90 ml + 10ml płynnej biomasy – biomass suspension	3,30	30,82

Na podstawie analizy ekstrakcyjno-wagowej stwierdzono zmniejszenie ilości tłuszczu w badanych próbkach zawierających szczepionkę w porównaniu z kontrolną próbą bez szczepionki (tab. 2). Najwyższy (18.10%) stopień przereagowania tłuszczu (w stosunku do kontroli) obserwowano w obecności 50% granulek w ZZB. Dodatek 10 lub 20 ml płynnej biomasy drożdży obniżał jego zawartość odpowiednio o 13.30 i 12.50%. Podobne działanie wykazywał dodatek niższych dawek granulek (10, 20 i 25 ml granulek), powodując jedynie ~ 10% ubytek tłuszczu. Najniższy, bo tylko 5% ubytek odnotowano po wprowadzeniu 50 ml płynnej biomasy (tab. 2).



Rys. 1. Tendencja zmian ilościowych i jakościowych w składzie kwasów tłuszczowych w Zaolejonej Ziemi Bielącej (ZZB) po zastosowaniu różnych form i ilości szczepionki *Yarrowia lipolytica*. A – drożdże immobilizowane, B – płynna biomasa

Fig. 1. The quantity and quality content of fatty acids in spent bleaching earth (SBE) after using different forms and amount of inoculum *Yarrowia lipolytica*. A – immobilized yeast, B – biomass suspension

Po zakończeniu procesu w próbkach kontrolnych zidentyfikowano niższe (C6 – C10) oraz wyższe (C16 – C18) kwasy tłuszczowe, co świadczy o samorzutnych przemianach wyjściowej substancji tłuszczowej na drodze biokonwersji, gdyż w wyjściowym materiale jedynymi składnikami substancji tłuszczowej były kwasy C18 i kwas cyklopentaundekanowy (C16 – cykliczny). Skład kwasów tłuszczowych w ZZB szczepionej preparatami drożdży porównywano z kontrolą, którą stanowiła ZZB podlegająca samorzutnym przemianom, zachodzącym w tych samych warunkach. Skład ten zależał od typu szczepionki i jej dawki (rys. 1). We wszystkich próbach w odniesieniu do kontroli odnotowano

obniżenie zawartości kwasów heksanowego, heptanowego i oktanowego oraz wzrost zawartości kwasu nonanowego i kwasów osiemnastowęglowych. W obecności granulek (25 ml granulek) obserwowano dodatkowo obniżenie ilości kwasu, heksadekanowego i oktadekanowego. Natomiast w obecności najwyższej dawki szczepionki (50%) niezależnie od jej formy wzrastała ilość kwasów C16 i C18.

W tych warunkach powstawały głównie kwasy nasycone o długości łańcucha C6 – C18, a zwłaszcza kwasy niskowęglowe C8 – C9; ich stosunek wynosił odpowiednio 1:1,7 dla układów ze szczepionką immobilizowaną wprowadzaną w ilości 50, 20 i 10% oraz 1:1,9 dla 25% (w kontroli 1:1). Natomiast w przypadku szczepionki wprowadzanej w formie płynnej biomasy te zależności przedstawiały się następująco: 1:1,9 dla 10%, 1:1,8 dla 50% oraz 1:1,4 dla 20%.

Forma szczepionki drożdży *Y. lipolytica* (płynna biomasa lub komórki immobilizowane – granulki) wpływała w niewielkim stopniu na zmiany sensoryczne badanych próbek ZZB. Zapach, barwa i konsystencja ZZB ze szczepionkami prawie nie różniły się od zapachu próbki kontrolnej, chociaż same granulki wykazywały wyraźnie gnilny zapach (tab. 3).

Tabela 3. Ocena sensoryczna badanych próbek ZZB traktowanych płynną biomasą lub immobilizowanymi drożdżami *Yarrowia lipolytica*

Table 3. The sensory assessment of tested SBE samples treated by liquid biomass or immobilized yeast *Yarrowia lipolytica*

Próbka – Sample	Ocena sensoryczna – Sensoric evaluation	
	Wygląd – Apparence	Zapach – odour
ZZB (kontrola) – nie zaszczipiona ZZB (control) – not inoculated	Barwa żółta, konsystencja sypka, bardzo drobne ziarna – yellow colour	Typowy zapach ziemi zaolejonej – oil
Granulki (kontrola) – 100% granulek Bids (control) – 100% beads	Kontrolne granulki – control bids	Nieprzyjemny gnilny zapach putrid
50% ZZB + 50% granulek – beads	Barwa żółta, konsystencja sypka, bardzo drobne ziarna – yellow colour	Typowy zapach ziemi zaolejonej – oil
75% ZZB + 25% granulek – beads	Barwa żółta, konsystencja sypka, bardzo drobne ziarna – yellow colour	Lekki olejowy zapach light oil
50% ZZB + 50% zawiesina biomasy – biomass suspension	Barwa żółta, zawiesina – yellow colour	Intensywny zapach ziemi zaolejonej – intensive oil

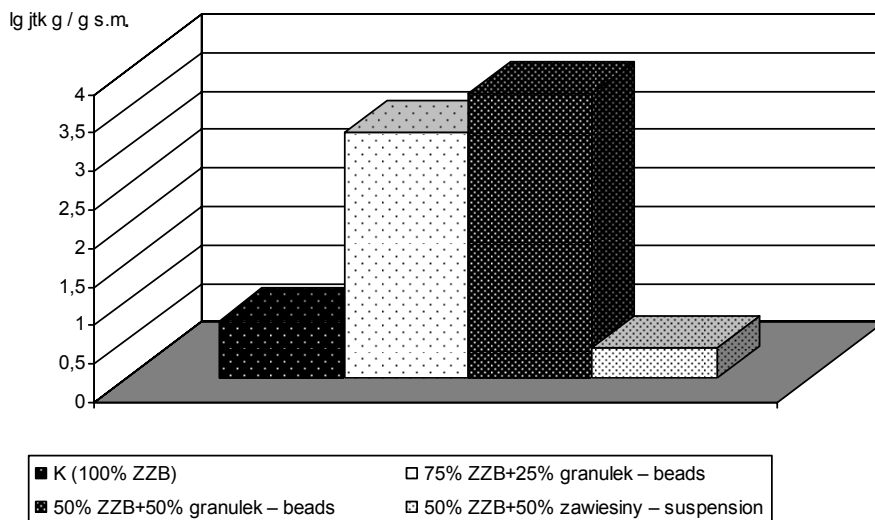
Twardość granulek kontrolnych (świeżych) i przetrzymywanych w ziemi oraz w lodówce oznaczona aparatem INSTRON 5544 wykazała, że wartość siły (N) użytej do zgniecenia granulek była zróżnicowana i zależała od „wieku” granulek oraz sposobu ich przechowywania (tab. 4). Obecność ZZB zwiększała trwałość granulek przechowywanych w ziemi. Granulki „świeże” ze względu na dużą sprężystość wymagały użycia większej siły do zmiażdżenia niż granulki przechowywane bez ZZB, w przypadku których już niewielka siła powodowała całkowite ich zgniecenie.

Tabela 4. Wartości siły [N] potrzebnej do zgniecenia granulek z poszczególnych prób.
Table 4. The force value [N] needed to granule crushing from tested samples

Próba Sample	Stosunek gleby do szczepionki – Rate of soil to inocula [v:v]	Siła* – Force* [N]
po przechowywaniu after the process	50% ZZB + 50% granulek – beads	1,7
	75% ZZB + 25% granulek – beads	1,631
	0% ZZB + 100% granulek – beads	0,392
kontrol – control	granulki świeże – fresh beads	~5

* Średnia z 10 pomiarów – means of 10 measures

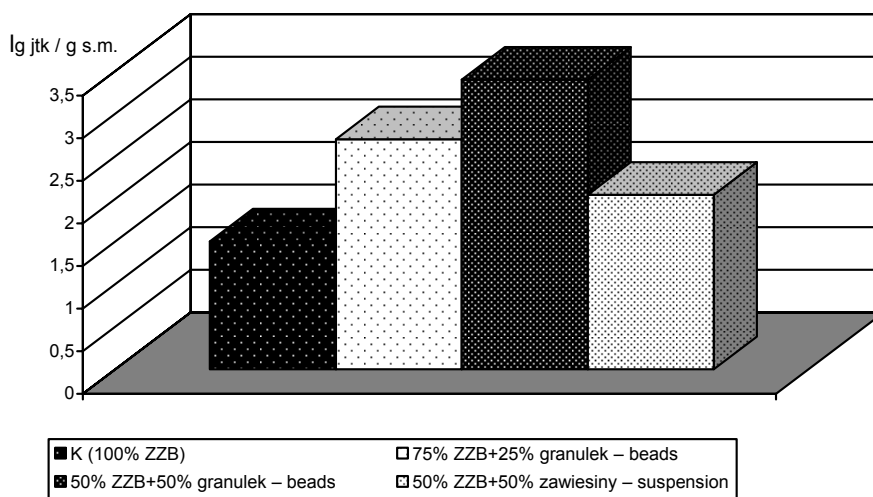
Mikrobiologiczna analiza ilościowa badanych próbek ZZB wykazała, że immobilizowana szczepionka *Y. lipolytica* stymuluje, w porównaniu z kontrolą, wzrost liczebności bakterii autochtonicznych – najwyższy, bo prawie 1000-krotny w obecności 50% dodatku granulek. Natomiast wprowadzenie szczepionki w postaci biomasy powodowało 3-krotne obniżenie liczebności bakterii (rys. 2).



Rys. 2. Ogólna liczba bakterii w próbkach przechowywanych w ziemi [$\log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ próby], w zależności od formy wprowadzanej szczepionki

Fig. 2. The total number of bacteria in samples stored in soil [$\log \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ sample], in dependence of the type of added inoculum

Mniejsze były wahania liczebności autochtonicznych grzybów, ale ich wzrost najsilniej stymulował także 50% dodatek granulek (rys. 3).



Rys. 3. Ogólna liczba drożdży i pleśni w próbkach przechowywanych w ziemi [$\log \text{ jtk} \cdot \text{g}^{-1}$ próby] w zależności od formy wprowadzanej szczepionki

Fig. 3. The total number of fungi in samples stored in soil [$\log \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ sample], in dependence of the type of added inoculum

DYSKUSJA

Niniejsza praca była próbą wykorzystania aktywności jednego ze szczepów drożdży *Y. lipolytica* w biodegradacji substancji tłuszczowych, wcześniej stosowanej do biodegradacji związków ropopochodnych w glebie metodą *in situ* [Robak 2006, Robak i in. 2006, Kowalczyk i in. 2009]. Nowością było wykorzystanie preparatów tych drożdży w niskich temperaturach do oczyszczania ZZB, a zwłaszcza szczegółowa analiza ilościowa i jakościowa pozostałości oleju i kwasów tłuszczowych. W odniesieniu do tego gatunku drożdży, w literaturze, doniesiono tylko o pozostałości TPH i WWA po bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem kreozotowym [Robak i in. 2011].

Wprowadzenie płynnej i unieruchomionej biomasy drożdży do ZZB nieznacznie zmieniło jej cechy sensoryczne, ale stymulowało rozwój mikroorganizmów (w porównaniu z kontrolą). Podobne zjawisko stymulacji rozwoju drobnoustrojów w badaniach terenowych zaobserwowali Żogała i in. [2005], a w stymulacji rozwoju roślin Vassilev i in. [2001].

W pracy podjęto również próbę sprawdzenia wytrzymałości granulek, powstałych w procesie immobilizacji drożdży *Y. lipolytica* w zależności od czynników zewnętrznych. Granulki z większości prób, poza kontrolą, były stosunkowo wytrzymałe na zgniecenie, co może sugerować wykorzystanie ich w ochronie środowiska. Granulki powodowały także zakwaszenie podłoża hodowlanego, co było wskaźnikiem ich żywotności. Efektem przemian stymulowanych zarówno biomasą, jak i drożdżami immobilizowanymi było obniżenie zawartości nasyconych kwasów tłuszczowych o długości łańcucha C6 – C8,

a wzrost C9, C16–C18. Niezależnie od typu szczepionki tendencje rozkładu substancji tłuszczowej są zbliżone, ale odmienne od procesów samorzutnych. Wynika stąd, że wykorzystując szczepionki, można ukierunkować proces biokonwersji substancji tłuszczowej. Csutak i in. [2010] opisali znaczenie kilku gatunków drożdży, w tym *Y. lipolytica* w bioremediacji, prezentując szlaki metabolizmu alkanów i kwasów tłuszczowych oraz poznane geny kodujące niektóre z niezbędnych enzymów. Natomiast Krzyśko-Łupicka [2009] obserwowała wzrost masy substancji tłuszczowych podczas prowadzenia badań z udziałem tego gatunku w temperaturze 22°C. Należy tutaj zaznaczyć, że drożdże *Y. lipolytica* są organizmami także zdolnymi do biosyntezy i akumulacji tłuszczu [Beopoulos i in. 2008]. Inni badacze na podstawie tego gatunku opracowali biosensor do analizy średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych [Alkasrawi i in. 1999].

Wykazane w pracy przemiany tłuszczu i częściowy ich ubytek wyraźnie wskazuje na wzrost i aktywność metaboliczną badanych drożdży nawet w okresie zimy. Reasumując, można stwierdzić, że otrzymane wyniki zdecydowanie zachęcają do dalszej kontynuacji badań nad zjawiskiem biodegradacji tłuszczów przy użyciu tych niekonwencjonalnych drożdży.

PIŚMIENNICTWO

- Alkasrawi M., Nandakumar R., Margesin R., Schinner F., Mattiasson B., 1999. A microbial biosensor based on *Yarrowia lipolytica* for the off-line determination of middle-chain alkanes. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 723–727.
- Beopoulos A., Mrozova Z., Thevenieau F., Le Dall M-T, Hapala I., Papanikolaou S., Chardot T., Nicaud J-M., 2008. Control of Lipid Accumulation in the Yeast *Yarrowia lipolytica*, *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (24), 7779–7789.
- Concalves C., Lopes M., Ferreira J.P., Belo I., 2009. Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology*, 100, 3759–3763.
- Csutak O., Stoica I., Ghindea R., Tanase A-M., Vassu T., 2010. Insights on yeast bioremediation processes. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (2), 5066–5071.
- Kowalczyk A., Michniewicz M., Robak M., 2009. Bioremediacja z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica*: komórki unieruchomione w alginianie oraz ich wpływ na autochtoniczną mikroflorę gleby i kiełkowanie owsa. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia*, 8 (3), 15–23.
- Krzyśko-Łupicka T., 2009. Dynamika zmian mikrobiologicznych i przemian tłuszczu w zaolejonej ziemi bielącej w zależności od jej modyfikacji. *U. O. Studia i Monografie*, 417. Wyd. Uniwersytetu Opolskiego.
- Kumider J., 1996. Utylizacja odpadów przemysłu rolno-spożywczego. *Aspekty towaroznawcze i ekologiczne*. Wyd. AR Poznań.
- Lara A.V, Park Y., 2003. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Procces. Biochem.*, 38, 1077–1082.
- Margesin R., 2000. Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted Alpine soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 3–10.
- Ostrowska A., Gawiński S., Szembiałka Z., 1991. *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*. Inst. Ochr. Środ., Warszawa, 115–117.
- Piotrowska-Cyplik A., 2011. Mikrobiologiczna degradacja kwasów tłuszczowych w odpadach z przemysłu tłuszczowego. *Rozprawy Naukowe*, 420. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań.
- Robak M., 2006. Czy możliwa jest bioremediacja środowiska z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica*? *Ekonatura*, 3, 22–23.

- Robak M., Żogała B., Rymowicz W., Wojtatowicz M., 2006. Sposób bioremediacji gruntu i prewencji rozprzestrzeniania się skażeń substancjami organicznymi. Zgłoszenie patentowe: P380007.
- Robak M., Boruckowski T., Drożdż W., Lazar Z., Baranowska M., Prządo D., Steininger M., 2011. Zastosowanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem kreozytowym. *Ochrona Środowiska*, 33 (2), 27–33.
- Vassilev N., Vassileva M., Azcon R., Medina A., 2001. Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarrowia lipolytica* inoculated into soil-plant system. *Biotechnology Letters* 23, 149–151.
- Yoshida M., Hashimoto K., 1986. Assessment of the pathogenicity of yeasts used in production of single cell protein. *Agric. Biol. Chem.*, 50 (8), 2117–2118.
- Żogała B., Robak M., Rymowicz W., Zientek K., Rusin M., Maruszczak J., 2005. Geoelectrical Observation of *Yarrowia lipolytica* Bioremediation of Petrol-Contaminated Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (5), 665–669.

ABILITY OF FREE AND IMMOBILIZED *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST BIOMASS TO FATTY COMPOUNDS IN SPENT BLEACHING EARTH

Abstract. The abilities of *Yarrowia lipolytica* yeast to biodegradation of fatty substances in spent bleaching earth (SBE) were investigated. Yeasts inocula (of different number of propagation units) were added to SBE as free or alginate immobilized (beads) biomass. The studied samples with SBE and yeasts were buried in soil and after winter the microbiological and chemical analyses were done as well as beads resistance and yeasts viability. The immobilized *Y. lipolytica* inoculum stimulated autochthonic microflora growth. The most important decrease of fatty substances in SBE was observed in presence of 50% of beads. Whereas, non depended on form and dose of yeasts was the composition of fatty acids in SBE samples, which was similar for different inocula but different from autonomous one. The effect of metabolic changes engendered by biomass suspension and immobilized cells was the decrease of contents of fatty acids of C6 – C8 and increase of C9, C16-C18. So, the inoculation of SBE with yeast could causes a specific bioconversion of fatty substances to long chain fatty acids. Noteworthy is the fact that bioremediation was going on during winter period.

Key words: spent bleaching earth, immobilized biomass, *Yarrowia lipolytica*, bioremediation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.12.2011

Do cytowania – For citation: Krzyśko-Lupicka T., Robak M., 2011. Drożdże *Yarrowia lipolytica* w biodegradacji substancji tłuszczowych Zaolejonej Ziemi Bielącej. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (4), 29–38.

RECENZENCI – REVIEWERS

prof. dr hab. Anna Rodziewicz
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Anna Peczyńska-Czoch
Politechnika Wrocławska

prof. dr hab. Ewa Sawicka-Sienkiewicz
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

dr hab. Anita Rywińska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Edmund Cibis
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

prof. dr hab. Waldemar Rymowicz
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Ewelina Dziuba
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Anna Krasowska
Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Małgorzata Robak
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Jerzy Pietkiewicz
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

prof. dr hab. Józefa Chrzanowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Grażyna Krasnowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

prof. dr hab. Tadeusz Miśkiewicz
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

SPIS TREŚCI CONTENTS

Małgorzata Krzywonos, Katarzyna Szymańska

- Glinka haloizytowa oraz węgiel aktywny jako potencjalne sorbenty
w procesie skutecznego odbarwiania buraczanego wywaru melasowego 5
Haloizite clay and activated carbon – a sorbents
for efficient decolorization of sugar beet molasses vinasse

Dariusz Chudy, Sławomir Jabłoński, Marcin Łukaszewicz

- Określenie dynamiki formowania biofilmu przez mikroorganizmy złoża
metanogennego techniką mikroskopii fluorescencyjnej i ciemnego pola
z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu 17
Determination the dynamics of biofilm formation by microorganisms
the methanogenic consortium, by the fluorescence microscopy
and dark field technique, using computer image analysis

Teresa Krzyśko-Lupicka, Małgorzata Robak

- Drożdże *Yarrowia lipolytica* w biodegradacji substancji tłuszczowych
Zaolejonej Ziemi Bielącej 29
Ability of free and immobilized *Yarrowia lipolytica* yeast biomass
to fatty compounds in Spent Bleaching Earth

Recenzenci – Reviewers 39