

Adam Muszyński, Maria Łebkowska, Joanna Kaczmarska, Grzegorz Wałętrzak

Badania czynników ograniczających pozyskiwanie polihydroksykwasów z osadu czynnego

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania wytwarzaniem biodegradowalnych polimerów, w tym polihydroksykwasów (PHA). Są to poliestry syntetyzowane przez liczną grupę mikroorganizmów, jako zapasowe źródło węgla i energii, w warunkach ograniczonej ilości istotnych składników pokarmowych, takich jak związki azotu czy fosforu, przy równoczesnym nadmiarze związków węgla. Najwcześniej odkrytym oraz najbardziej poznanym związkiem należącym do tej grupy jest kwas poli-3-hydroksymasłowy – P(3HB).

Wytwarzanie PHA może być prowadzone z zastosowaniem czystych kultur bakterii (*Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*), mikroorganizmów modyfikowanych genetycznie (rekombinowana *Escherichia coli*) oraz mieszaniny drobnoustrojów, takich jak osad czynny. Zaletą tej ostatniej metody jest przede wszystkim dostępność taniego źródła węgla w postaci oczyszczanych ścieków oraz możliwość wykorzystania w tym procesie produktu odpadowego, tj. osadu nadmiernego. Ze względu na niskie nakłady finansowe i eksploatacyjne oraz brak konieczności zachowania sterylnych warunków, metoda ta – w porównaniu z innymi sposobami pozyskiwania PHA – jest obecnie w centrum zainteresowań wielu badaczy.

Mikroorganizmy osadu czynnego mają zdolność do akumulacji PHA w warunkach ograniczonej zawartości tlenu lub związków azotu. Pośrednio zdolność ta jest wykorzystywana w oczyszczalniach ścieków komunalnych ze zintegrowanym usuwaniem związków węgla, azotu oraz fosforu, podczas którego mikroorganizmy osadu czynnego zostają poddane naprzemiennie warunkom beztlenowym i tlenowym.

Czynnikiem ograniczającym pozyskiwanie PHA na skalę przemysłową jest koszt jego wytwarzania w porównaniu z ceną polimerów syntetycznych. Cena 1 kg PHA uzyskanego z osadu czynnego wynosi od około 4 dol. (USA) [1] do nawet 11,8 dol. [2], co stanowi około 10÷15-krotność ceny polimerów ropopochodnych. Istotny problem stanowi odzyskiwanie PHA z biomasy. Do ekstrakcji PHA z komórek stosuje się rozpuszczalniki organiczne, których działanie wspomagane jest często dodatkiem podchlorynu sodu w celu dezintegracji ścian komórek. Ułatwienie pozyskiwania PHA z biomasy uzyskuje się również metodami mechanicznymi i enzymatycznymi. Podkreślić jednak należy,

że sposoby otrzymywania PHA z biomasy osadu czynnego, poza wysokimi kosztami, obarczone są licznymi wadami, m.in. małą skutecznością, degradacją i zanieczyszczeniem produktu oraz czasochłonnością procesu.

Celem pracy było porównanie wydajności procesu wytwarzania PHA przez czysty szczep *Cupriavidus necator* NCIMB 10442 (poprzednio *Ralstonia eutropha*) oraz osad czynny w warunkach nadmiaru zawartości węgla i ograniczonej ilości azotu w podłożu. Scharakteryzowano także zmiany w strukturze osadu czynnego wpływające na skuteczność wytwarzania i odzyskiwania PHA.

Materiały i metody

Podłoże do badań osadu czynnego

W badaniach zastosowano podłoże, którego skład był zmieniany w poszczególnych etapach eksperymentu. Pożywkę mineralną wg pracy [3] przygotowano z roztworów A i B. W skład roztworu A wchodziły następujące sole: KH_2PO_4 (2,3 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g), NaHCO_3 (0,3 g) oraz $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), natomiast w skład roztworu B wchodziły: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,58 g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,96 g), H_3BO_3 (0,6 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,56 g), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,62 g), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,34 g), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g) oraz $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,06 g), jako mikroelementy. Składniki roztworu A rozpuszczono w 1 dm³ wody destylowanej, zaś mikroelementy – w 1 dm³ 0,5 n HCl. Pełną pożywkę mineralną stanowił 1 dm³ roztworu A, do którego dodano 1 cm³ roztworu B.

Podłoże ze źródłami węgla i azotu sporządzono dodając do pożywki mineralnej octan sodu w ilości odpowiadającej ChZT równemu 5 gO₂/dm³ oraz (NH₄)₂SO₄ w ilości zapewniającej proporcję wagową C:N=10:1. Podłoże to oznaczono jako C5+N. Podłoża bez źródła azotu sporządzono dodając do pożywki mineralnej octan sodu w ilości zapewniającej ChZT równe 10 gO₂/dm³ (podłoże oznaczone jako C10) i 20 gO₂/dm³ (podłoże C20). Podłoże do regeneracji osadu (oznaczone jako R) stanowiła pożywka mineralna z dodatkiem (NH₄)₂SO₄ w ilości 20 mgN/dm³.

Podłoże do badań szczepu *Cupriavidus necator* NCIMB 10442

Hodowlę szczepu prowadzono w 8 sterylnych kolbkach Erlenmeyera zawierających po 100 cm³ podłoża tryptonowo-sojowego (TSB) z dodatkiem glukozy w ilości 20 g/dm³. Kolbki wytrząsano w łaźni wodnej (120 obr./min) w temperaturze 30 °C przez 48 h.

Układ doświadczalny

Biosyntezę PHA przez osad czynny prowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodyką wg pracy [4], w reaktorze laboratoryjnym o pojemności 13,6 dm³, wykonanym ze szkła organicznego (PMMA), wyposażonym w system napowietrzania. Do zaszczepienia zastosowano osad czynny z czyszczalni ścieków w Babcach Starych (koło Warszawy). Podłoże doprowadzono do reaktora przy pomocy czterech pomp perystaltycznych, sterowanych przez programatory czasowe. Badania prowadzono przez trzy miesiące w cyklach tygodniowych. Każdy cykl badań rozpoczęto przy początkowej objętości podłoża z osadem czynnym równym 2 dm³ i zawartości suchej masy równej 1 g/dm³. Następnie przez kolejną dobę podawano do reaktora 1 dm³ podłoża C5+N w celu namnożenia biomasy. W czasie kolejnych 5 d do reaktora wprowadzono podłoża C10 (1 dm³/d) i C20 (1 dm³/d przez 4 d). W 10. tygodniu eksperymentu podłoże C20 zastąpiono podłożem C10, które dawковано przez 5 d. Brak azotu w podłożu miał stymulować kumulację PHA przez mikroorganizmy. W każdej 7. dobie cyklu odbierano 6 dm³ osadu, a pozostały 1 dm³ poddawano regeneracji przez 1 d dawkując podłoże R. Celem regeneracji osadu było zużycie skumulowanych PHA w komórkach. Następnie doprowadzano zawartość suchej masy osadu do 1 g/dm³ i rozpoczynano kolejny cykl badań.

Metody analityczne

Granulki PHA w komórkach bakterii barwiono sudanem czarnym i błękitem nilu [5]. Badania mikroskopowe osadu czynnego przeprowadzono zgodnie z rutynową metodyką [6], przy wykorzystaniu mikroskopu epifluorescencyjnego Nikon Eclipse 50i.

Zawartość azotu amonowego oznaczono metodą bezpośredniej nessleryzacji (HACH), natomiast ChZT i zawartość zawiesin ogólnych w reaktorze oznaczono odpowiednio zgodnie z PN-ISO 6060:2006 i PN-EN 872:2007.

Zawartość PHA w biomacie osadu czynnego oznaczono metodą chromatograficzną po ich uprzednim przeprowadzeniu w estry metylowe 3-hydroksykwasów. Po liofilizacji osad umieszczono w środowisku chloroformu oraz metanolu zakwaszonego kwasem siarkowym i estryfikowano w temperaturze 100 °C przez 20 h. Po osuszeniu i przesączeniu frakcji organicznej, estry metylowe 3-hydroksykwasów oznaczono chromatograficznie przy użyciu chromatografu gazowego firmy Varian GC 3800 z kolumną kapilarną VF-5ms (średnica wewnętrzna 0,25 mm, długość 30 m) oraz detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Zastosowano następujące warunki rozdzielania: objętość próbki – 1 µl, strumień objętości gazu nośnego (hel) – 1 cm³/min, temperatura dozownika – 250 °C, podział strumienia gazu nośnego – 1:10, temperatura początkowa pieca kolumn – 80 °C, przyrost temperatury 10 °C/min do temperatury 240 °C, temperatura detektora – 300 °C.

PHA pozyskiwano z hodowli szczepu *C. necator* po 48 h oraz z hodowli osadu czynnego po zakończeniu każdego cyklu metodą bezpośredniej ekstrakcji chloroformem i wytrącania w n-heksanie. W tym celu odwirowywano 500 cm³ hodowli osadu czynnego lub 100 cm³ hodowli *C. necator* (10 tys. obr./min, 15 min). Odwirowaną biomasę przenoszono do uprzednio wysuszonych w temperaturze 55 °C i zważonych gilz ekstrakcyjnych. Gilzy z biomasą suszono w temperaturze 55 °C, a następnie z różnicy mas gilzy z wysuszoną biomasą i wysuszonej pustej gilzy określano zawartość biomasy. Gilzy z biomasą umieszczano

w aparacie Soxhleta i ekstrahowano PHA przez 6 h przy użyciu chloroformu. Po zakończeniu ekstrakcji wytrącano PHA wkraplając powoli roztwór chloroformowy do równoważnej ilości zimnego n-heksanu i mieszano powoli aż do całkowitego wytrącenia biopolimeru. Biopolimer oddzielano od cieczy na twardym sączku i wagowo określano pozyskany PHA w przeliczeniu na zawartość biomasy.

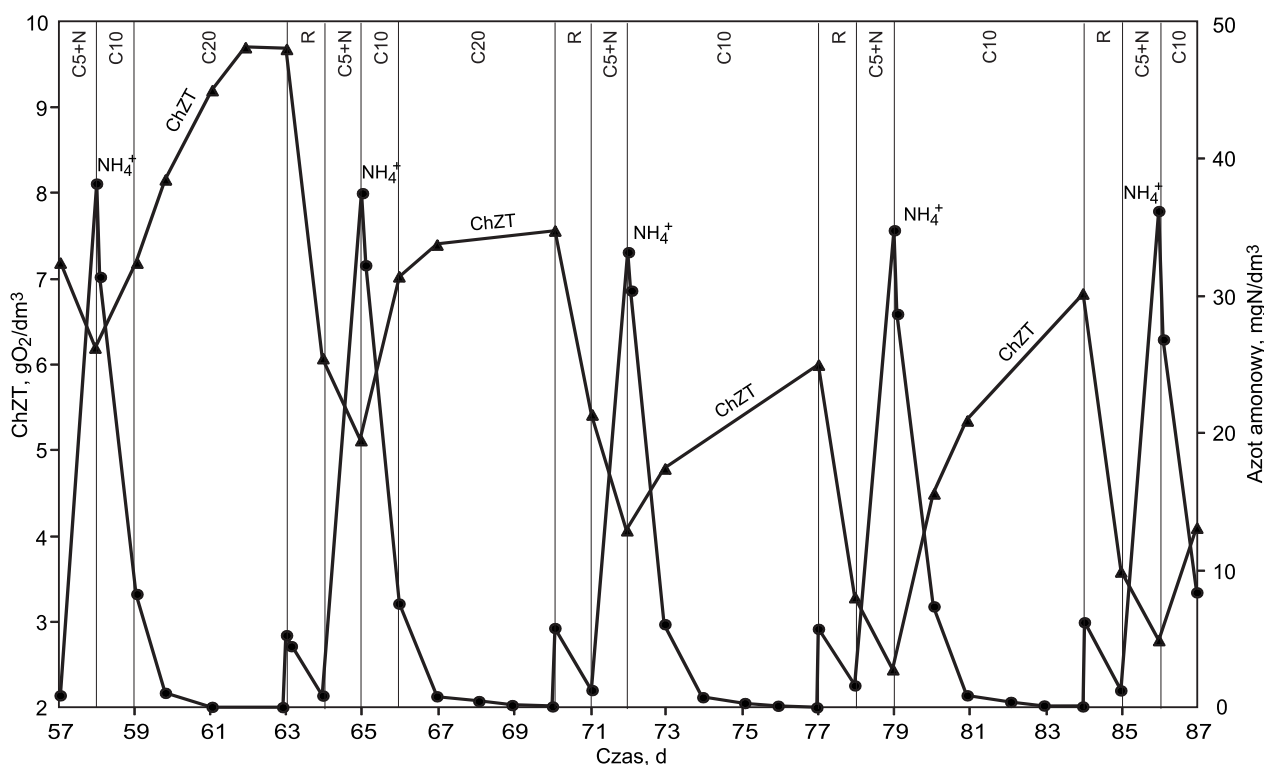
Wyniki badań

Zastosowana metoda biosyntezy i odzyskiwania PHA okazała się w pełni skuteczna jedynie w przypadku czystej hodowli szczepu *C. necator* NCIMB 10442, która umożliwiła pozyskanie PHA w ilości 49±6% w przeliczeniu na zawartość suchej masy komórek. W trakcie eksperymentu z użyciem osadu czynnego zaobserwowano wyraźne zmiany w strukturze kłaczek i biocenozie osadu. Początkowo hodowla charakteryzowała się typową biocenozą osadu z miejskiej oczyszczalni ścieków. Dominowały w niej orzęski osiadłe i kroczące, kłaczki były dobrze wykształcone, regularne i zbite, z niewielką ilością mikroorganizmów nitkowatych. Osad łatwo sedymentował, a ciecz nadosadowa była klarowna, bez zawiesin. W 3. tygodniu badań stwierdzono obecność dużej liczby orzęsków wolnożyjących, formowanie się dużych skupisk śluzu i zwiększenie liczby mikroorganizmów nitkowatych. W rezultacie pogorszeniu uległy zdolności sedymentacyjne osadu, co skutkowało także trudnościami w jego sączeniu. Począwszy od 4. tygodnia badań w osadzie stwierdzono masowy rozwój drobnych wiciowców, jego kłaczki były słabo wykształcone, dominowały skupiska mikroorganizmów nitkowatych i wytwarzających śluz.

Barwienie P(3HB) sudanem czarnym i błękitem nilu wykazało obecność granulek biopolimeru w komórkach bakterii zarówno podczas stosowania podłoża bez dodatku źródła azotu (C10 i C20), jak również na etapie regeneracji hodowli, co wskazywało na kumulację PHA i brak zużycia biopolimeru podczas regeneracji. Potwierdziły to analizy chromatograficzne zawartości PHA w biomacie, wykonane w 49. i 50. dobie eksperymentu. Biomasa kumulowała tylko P(3HB), którego zawartość pod koniec dawkowania podłoża C20 bez azotu wynosiła 10,4%, podczas gdy po regeneracji uzyskano 18,8% w przeliczeniu na suchą masę.

Badania wykazały, że mikroorganizmy, pomimo procesu regeneracji, nie zużywały uprzednio zakumulowanego P(3HB), lecz go nadal gromadziły, co mogło być wynikiem obecności związków organicznych w komorze w trakcie regeneracji. Największe wartości ChZT w trakcie trwania pojedynczego cyklu wystąpiły pod jego koniec, tj. przed regeneracją. Mikroorganizmy nie zużywały dawkowego octanu sodu, natomiast nadmiar węgla kumulował się wraz z każdym następnym cyklem. Z tego względu postanowiono zmniejszyć dwukrotnie ilość octanu sodu w doprowadzanym podłożu, zastępując podłoże C20 podłożem C10. Jednak pod koniec cyklu ciągle pozostawał nadmiar związków organicznych w hodowli, zaś azot amonowy zużywany był przez mikroorganizmy niemal całkowicie w ciągu pierwszych 3 d każdego cyklu (rys. 1).

Pomimo ponad 10% zawartości P(3HB) w biomacie oznaczonej chromatograficznie, ilość odzyskanego polimeru metodą bezpośredniej ekstrakcji chloroformem i wytrącania w n-heksanie była znacznie mniejsza i nie przekraczała 5% PHA w przeliczeniu na suchą masę osadu czynnego (w większości przypadków wydajność produkcji PHA wynosiła 0÷1,6%).



Rys. 1. Zmiana zawartości związków organicznych i azotu amonowego w reaktorze podczas dawkowania pożywek o zmiennej ilości octanu sodu (C5+N – ChZT=5 gO₂/dm³ + azot (namnażanie biomasy), C10 – ChZT=10 gO₂/dm³ (kumulacja PHA), C20 – ChZT=20 gO₂/dm³ (kumulacja PHA), R – regeneracja biomasy)
 Fig. 1. Changes in concentration of organic substances and ammonia in the reactor during dosing of media with different concentration of sodium acetate (C5+N – COD=5 gO₂/dm³ + nitrogen (biomass synthesis), C10 – COD=10 gO₂/dm³ (PHA synthesis), C20 – COD=20 gO₂/dm³ (PHA synthesis), R – biomass regeneration)

Dyskusja wyników

Biosynteza PHA w komórkach mikroorganizmów jest stymulowana zmiennością warunków tlenowych lub ograniczeniem zawartości pierwiastków biogennych (azotu i fosforu) przy nadmiarze węgla organicznego. W niniejszej pracy zastosowano podłoża z azotem na etapie hodowli biomasy osadu czynnego, a następnie azot wyeliminowano celem intensyfikacji gromadzenia PHA. Inni autorzy, badając wpływ azotu na procesy kumulacji PHA przez osad czynny wykazali, że optymalny stosunek C:N wynosił 50:1 [7], 125:1 [8] lub 144:1 [9]. W przypadku ścieków po destylacji brzożki ryżowej stosunek C:N był w zakresie 101:1÷113:1 [10].

Zawartość związków węgla ma wpływ na wydajność wytwarzania PHA. W niniejszej pracy jako źródło węgla zastosowano octan sodu w ilości odpowiadającej wartości ChZT równej 5 gO₂/dm³ (podczas namnażania biomasy) oraz wartościom 10 gO₂/dm³ i 20 gO₂/dm³ (podczas kumulacji PHA). Przy użyciu podobnych ilości związków węgla uzyskano ponad 50% zawartość P(3HB) w biomacie [4]. Dane literaturowe wskazują, że przy zawartości octanu sodu 5,5 g/dm³ można uzyskać 46,5% P(3HB) w biomacie osadu czynnego przy ciągłym natlenianiu hodowli i braku azotu i fosforu w pożywce [11]. Zaobserwowano jednak [12], że przy ciągłym napowietrzaniu i zawartości octanu sodu w przedziale 0,5÷1,0 g/dm³ mikroorganizmy zużywały tylko około 50% doprowadzanego substratu w ciągu 24 h. W niniejszej pracy stwierdzono brak pełnego wykorzystania octanu sodu. Przy jego dużej zawartości (ChZT=10÷20 gO₂/dm³) w podłożu uzyskano zaledwie 10,4% P(3HB), a po regeneracji 18,8% (w przeliczeniu na suchą masę osadu czynnego).

Znaczna zawartość związków węgla, przy braku źródeł azotu i fosforu, wywołuje istotne zmiany w biocenozie i jest powodem pogorszenia właściwości sedymentacyjnych i struktury osadu. Wykazano [8], że podczas biosyntezy PHA niedobór fosforu powodował pęcznienie osadu wywołane pojawieniem się dużej ilości śluzu i zwiększeniem lepkości hodowli, podczas gdy okresowy brak azotu był odpowiedzialny za nadmierny rozwój mikroorganizmów nitkowatych. Podobne zjawiska zaobserwowano w trakcie niniejszych badań. Osad czynny, w którym początkowo występowały głównie organizmy charakterystyczne w przypadku prawidłowo pracującego osadu czynnego z oczyszczalni miejskiej, został po kilku tygodniach zdominowany przez mikroorganizmy nitkowate i wytwarzające dużą ilość śluzu. Podczas nadmiernego rozwoju bakterii produkujących śluz, a co za tym idzie – nadmiernej ilości biopolimerów zewnątrzkomórkowych, następuje tzw. pęcznienie lepkie [5]. Dochodzi wówczas do zmiany konsystencji ścieków w galaretowatą masę i pogorszenie sedymentacji osadu. Dodatkowo, przy intensywnym napowietrzaniu, może pojawić się pienienie, co zostało zaobserwowane również w przypadku badanego osadu.

Przy niedoborze azotu i fosforu w stosunku do ilości węgla rozwijają się bakterie nitkowate, które mogą występować również w warunkach niedostatecznego natlenienia, przy zbyt dużym obciążeniu osadu czynnego ładunkiem zanieczyszczeń. W końcowym etapie eksperymentu wysoki stosunek C:N wpłynął na dominację bakterii wolnożyjących i grzybów w osadzie czynnym, a więc wystąpiło zjawisko wzrostu rozproszonego mikroorganizmów – kłaczkii uległy destrukcji. Niewątpliwie te negatywne zmiany w biocenozie osadu, całkowita utrata jego zdolności sedymentacyjnych i trudności w odwadnianiu biomasy,

sprawywałyby poważne problemy w reaktorach technicznych podczas procesu separacji, stając się poważnym czynnikiem ograniczającym skuteczność pozyskiwania polihydroksykwasów z osadu czynnego. Ze względu na częsty spadek przyrostu biomasy, spowodowany zachwianiem stosunku C:N:P podczas biosyntezy PHA [8], konieczne staje się wprowadzanie faz regeneracji osadu w obecności azotu i fosforu. W celu uzyskania maksymalnej skuteczności wytwarzania PHA, zaproponowano przyjęcie zawartości osadu czynnego około 3 g/dm^3 [9]. W trakcie niniejszych badań zawartość biomasy zmieniała się w zakresie $1\text{--}4 \text{ g/dm}^3$.

Zmiany w strukturze kłaczków osadu, a szczególnie pojawienie się polimerów zewnątrzkomórkowych (w tym śluzu), utrudniają dostęp rozpuszczalnika organicznego do wnętrza komórek. Zaobserwowano, że stosowanie kultur mieszanych do wytwarzania PHA może powodować poważne trudności w końcowym etapie odzyskiwania biopolimeru z komórek, w porównaniu z hodowlami czystymi, szczególnie szczepów rekombinowanych [13]. Ze względu na ograniczony dostęp rozpuszczalników do wnętrza biomasy konieczne jest zastosowanie dodatkowych operacji w celu lizy komórek, co znacznie podnosi koszty procesu. Wykazano też, że utrzymanie stabilnej biosyntezy PHA przez kultury mieszane jest często znacznie trudniejsze niż w przypadku czystych hodowli [13]. W celu zwiększenia stopnia odzyskiwania P(3HB) z osadu czynnego zastosowano szereg modyfikacji procesu ekstrakcji [14]. Największą rozpuszczalność biopolimeru uzyskano w chloroformie (80%), zaś wytrącanie P(3HB) najkorzystniej było prowadzić w metanolu (95% skuteczność). Podkreślono też, że w porównaniu z czystymi hodowlami istotnym czynnikiem ograniczającym stopień odzyskania P(3HB) są substancje przegradzające znajdujące się w osadzie czynnym.

Penetrację chloroformu w głąb biomasy można zwiększyć stosując podchloryn sodu, który rozpuszcza większość składników komórkowych. Metoda pozyskiwania biopolimeru przy wstępnym rozpuszczeniu ściany komórkowej jest skuteczna, jednak również powoduje degradację granulek P(3HB) [10, 15–17]. Z tego względu zaproponowano kombinację mieszaniny podchlorynu sodu i chloroformu [16]. Rozpuszczenie P(3HB) zachodziło równolegle z trawieniem komórek oraz uwalnianiem granulek polimeru w wyniku działania podchlorynu sodu. W porównaniu z sekwencyjnym zastosowaniem podchlorynu sodu i chloroformu metoda ta jest względnie mniej agresywna w stosunku do P(3HB), jednak degradacji całkowicie nie wyeliminowano. Zaletą jest natomiast znacznie lepszy dostęp rozpuszczalnika do wnętrza komórek oraz tym samym większy stopień rozpuszczenia polimeru – uzyskano 91% wydajność ekstrakcji P(3HB) z komórek bakterii *Alcaligenes eutrophus*, a czystość produktu przewyższała 97%. Inną modyfikacją minimalizującą degradację P(3HB) jest zastosowanie mieszaniny podchlorynu sodu i środków powierzchniowo czynnych (bądź też ich samych), takich jak laurylosiarczan (dodecylsiarczan) sodu (SDS) czy niejonowych komercyjnych preparatów z serii Triton® X, które nie degradują polimeru [15, 18].

Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie mechanicznej dezintegracji komórek za pomocą młynów kulowych lub homogenizatorów wysokociśnieniowych [17, 18], bądź też nadzwyczaj skutecznej (lecz kosztownej) enzymatycznej lizy ścian komórkowych [19]. Skuteczność procesu dezintegracji czy też ekstrakcji zależy w dużej mierze od rodzaju mikroorganizmów oraz warunków hodowli i z tego

względem metoda powinna być w każdym przypadku dobierana indywidualnie, co dodatkowo komplikuje proces pozyskiwania PHA. Ekstrakcja rozpuszczalnikami prowadzi do częściowego zniszczenia unikalnej struktury granulek PHA, która jest przydatna w pewnych zastosowaniach, np. do wytwarzania włókien [15]. Roztwór z polimerem zawierający więcej niż 5% P(3HB) jest bardzo lepki, więc usunięcie go z wnętrza komórki jest trudne.

Zastosowana w niniejszej pracy metodyka pozyskiwania PHA, choć nieskuteczna w odniesieniu do osadu czynnego, okazała się odpowiednia do odzyskiwania biopolimeru z hodowli szczepu *C. necator* NCIMB 10442, który wyniósł $49 \pm 6\%$ w przeliczeniu na zawartość suchej masy komórek już po 48 h trwania hodowli. W celu uzyskania wysokiej wydajności biosyntezy PHA przez osad czynny powinna być odpowiednio dobrana zawartość związków organicznych w ściekach. Zbyt duża ich ilość powoduje pogorszenie jakości osadu i wytwarzanie także innych biopolimerów, aniżeli PHA. Te zewnątrzkomórkowe polimery prowadzą do zmian struktury osadu i utrudniają odzyskiwanie PHA powszechnie przyjętą metodą ekstrakcji. Stąd oznaczenie ilości PHA może nie wykazać właściwej wydajności. Zjawisko nie wystąpiło w hodowli czystego szczepu, w której nie zaobserwowano nadprodukcji związków o charakterze śluzów.

Podsumowanie

Zastosowanie mikroorganizmów osadu czynnego do biosyntezy PHA wymaga uważnego doboru parametrów i ciągłej kontroli jakości osadu. Wysoki stosunek węgla do azotu w ściekach stymulował rozwój mikroorganizmów nitkowatych i wytwarzających śluz, co negatywnie wpływało na strukturę osadu czynnego. Zwiększona lepkość i gęstość hodowli sprawiała trudności podczas operacji związanych z oddzieleniem biomasy od ścieków. Metoda bezpośredniej ekstrakcji P(3HB) z biomasy za pomocą chloroformu nie zawsze była skuteczna – stopień pozyskania biopolimeru zależał w głównej mierze od stopnia penetracji rozpuszczalnika w głąb komórek. W trakcie biosyntezy należy kontrolować zawartość związków organicznych, gdyż niewykorzystany w pierwszej fazie węgiel organiczny był dostępny podczas regeneracji biomasy, co negatywnie wpływało na późniejszą kumulację biopolimeru.

Autorzy dziękują dr Izabeli Radeckiej (Uniwersytet Wolverhampton, Wielka Brytania) za udostępnienie szczepu do badań i dr. inż. Tomaszowi Pokojowi (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska) za cenne uwagi i wskazówki podczas realizacji pracy oraz wykonanie analiz chromatograficznych.

LITERATURA

1. M. REIS, L. SERAFIM, P. LEMOS, A. RAMOS, F. AGUIAR, M. VAN LOOSDRECHT: Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2003, Vol. 25, pp. 377–385.
2. S. MUDLIAR, A. VAIDYA, M. SURESH KUMAR, S. DAHIKAR, T. CHAKRABARTI: Techno-economic evaluation of PHB production from activated sludge. *Clean Technology and Environmental Policy* 2008, Vol. 10, pp. 255–262.
3. M. CHOI, S. YOON: Polyester biosynthesis characteristics of *Pseudomonas citronellolis* grown on various carbon sources, including 3-methyl-branched substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 1994, Vol. 60, pp. 3245–3254.

4. T. POKÓJ, E. KLIMIUK, M. KUCZAJOWSKA-ZADROŻNA: Gromadzenie polihydroksykwasów (PHA) w osadzie czynnym w warunkach limitowanego stężenia azotu. Cz. I. Wpływ parametrów technologicznych na gromadzenie kwasu poli-3-hydroksymasłowego (P3(HB)). *Biotechnologia* 2005, vol. 71, ss. 197–213.
5. R.J. SEVIOUR, P.H. NIELSEN: *Microbial Ecology of Activated Sludge*. IWA Publishing, London 2010.
6. T. SŁOMCZYŃSKI, A. MUSZYŃSKI: *Biologia środowiska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2010.
7. A. KHARDENAVIS, P.K. GUHA, M. SURESH KUMAR, S.N. MUDLIAR, T. CHAKRABARTI: Activated sludge is a potential source for production of biodegradable plastics from wastewater. *Environmental Technology* 2005, Vol. 26, pp. 545–552.
8. Q. WEN, Z. CHEN, T. TIAN, W. CHEN: Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. *Journal of Environmental Sciences* 2010, Vol. 22, pp. 1602–1607.
9. M. SURESH KUMAR, S. MUDLIAR, K. REDDY, T. CHAKRABARTI: Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. *Bioresource Technology* 2004, Vol. 95, pp. 327–330.
10. A. KHARDENAVIS, M. SURESH KUMAR, S. MUDLIAR, T. CHAKRABARTI: Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly β -hydroxybutyrate. *Bioresource Technology* 2007, Vol. 98, pp. 3579–3584.
11. Z. LIU, Y. WANG, N. HE, J. HUANG, K. ZHU, W. SHAO, H. WANG, W. YUAN, Q. LI: Optimization of polyhydroxybutyrate (PHB) production by excess activated sludge and microbial community analysis. *Journal of Hazardous Materials* 2011, Vol. 185, pp. 8–16.
12. A. CHUA, H. TAKABATAKE, H. SATOH, T. MINO: Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: Effect of pH, sludge retention time (SRT) and acetate concentration in influent. *Water Research* 2003, Vol. 37, pp. 3602–3611.
13. K. JOHNSON, Y. JIANG, R. KLEEREBEZEM, G. MUYZER, M. VAN LOOSDRECHT: Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules* 2009, Vol. 10, pp. 670–676.
14. K. MAHAPATRA, M. SURESH KUMAR, A.N. VAIDYA, T. CHAKRABARTI: Production and recovery process of polyhydroxybutyrate (PHB) from waste activated sludge. *Journal of Environmental Science and Engineering* 2007, Vol. 49, pp. 164–169.
15. J. RAMSAY, E. BERGER, B. RAMSAY, C. CHAVARIE: Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnology Techniques* 1990, Vol. 4, pp. 221–226.
16. S. HAHN, Y. CHANG, B. KIM, H. CHANG: Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering* 1994, Vol. 44, pp. 256–261.
17. I. TAMER, M. MOO-YOUNG, Y. CHISTI: Optimization of poly(β -hydroxybutyric acid) recovery from *Alcaligenes latus*: Combined mechanical and chemical treatments. *Bioprocess Engineering* 1998, Vol. 19, pp. 459–468.
18. I. TAMER, M. MOO-YOUNG: Disruption of *alcaligenes latus* for recovery of poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of high-pressure homogenization, bead milling and chemically induced lysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 1998, Vol. 37, pp. 1807–1814.
19. S.T.L. HARRISON, H.A. CHASE, J.S. DENNIS: The lysis of Gram-negative *Alcaligenes eutrophus* by enzymes from *Cytophaga*. *Biotechnology Techniques* 1991, Vol. 5, pp. 115–120.

Muszynski, A., Lebkowska, M., Kaczmarska, J., Waletzak, G. Factors Limiting Polyhydroxyalkanoates Recovery from Activated Sludge. *Ochrona Środowiska* 2013, Vol. 35, No. 1, pp. 19–23.

Abstract: Factors limiting polyhydroxyalkanoates (PHA) recovery from activated sludge were examined. The biosynthesis of the polymer was carried out for 3 months in 7-day cycles in a laboratory reactor inoculated with activated sludge from municipal wastewater treatment plant. The reactor was continuously aerated and PHA synthesis was stimulated by nitrogen limitation in the medium. PHA recovery at the end of each cycle was performed by biomass centrifugation, extraction of the biopolymer with chloroform and its precipitation with n-hexane. Excess organic carbon in the medium was utilized by microorganisms to accumulate PHA during sludge regeneration phase. Parameters

of the biosynthesis were conducive to production of other biopolymers, which lowered efficacy of PHA recovery from biomass, despite presence of PHA granules in the bacterial cells in the amount of 10–19% (dry weight). The PHA recovery by extraction with chloroform and subsequent precipitation of biopolymer with n-hexane was inefficient. High carbon to nitrogen ratio in the medium stimulated growth of filamentous and slime-forming microorganisms. It resulted in the increased viscosity and density of the culture, difficulties during biomass separation and limited chloroform penetration into bacterial cells. However, the method of PHA biosynthesis and recovery proved efficient for the pure culture of *Cupriavidus necator* NCIMB 10442 (49% PHA per dry weight of cells).

Keywords: PHA recovery, *Cupriavidus necator*, activated sludge.