

Magdalena CZEMIERSKA¹, Aleksandra SZCZEŚ², Joanna KOWALSKA¹, Anna JAROSZ-WILKOŁAZKA¹

e-mail: magdalena.czemiarska@poczta.umcs.lublin.pl

¹ Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin² Zakład Zjawisk Międzyfazowych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Synteza, oczyszczanie i charakterystyka bioflokulantów izolowanych ze szczepów bakteryjnych

Wstęp

Akumulacja toksycznych substancji pochodzących z różnych gałęzi przemysłu jest szczególnie alarmująca w przypadku zbiorników wodnych i gleby. Produkty powstające w trakcie procesów przemysłowych zawierają metale ciężkie oraz inne zanieczyszczenia, które bardzo trudno wyeliminować m.in. ze względu na ich niewielkie masy cząsteczkowe [Lee i in., 2014]. Oczyszczanie wody za pomocą powszechnie znanych metod takich jak filtracja czy też dekantacja często nie przynosi spodziewanych efektów [Brathby, 2006].

Interesującym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie produktów przemian metabolizmu wtórnego bakterii i grzybów, które będąc polimerami zdolne są do przeprowadzania procesu flokulacji. Polimery te (bioflokulanty) uczestniczą w wiązaniu zawieszonych w roztworach cząstek w większe agregaty, które pod wpływem grawitacji opadają na dno zbiorników i dzięki temu umożliwiają usunięcie zanieczyszczeń. Ze względu na duże możliwości tego rodzaju polimerów poszukuje się sposobów pozyskiwania nowych organizmów wytwarzających takie cząsteczki.

Bioflokulanty dzięki swym właściwościom cieszą się zainteresowaniem naukowców zajmujących się ochroną środowiska. Takie cechy bioflokulantów jak biodegradowalność, nietoksyczność zarówno dla człowieka jak i środowiska naturalnego sprawiają, że stosuje się je coraz częściej i w różnych dziedzinach.

Jednak preparaty flokulantów otrzymywane z naturalnych źródeł są wytwarzane przez organizmy z niską wydajnością. Dlatego też istnieje zapotrzebowanie na modyfikacje warunków hodowli mikroorganizmów i prowadzenie bardziej wydajnych hodowli.

Przeprowadzone badania miały na celu porównanie szczepów bakteryjnych pod względem aktywności flokulacyjnej, ustalenie czasu trwania hodowli dla każdego szczepu oraz analizę podstawowych zmian biochemicznych zachodzących w czasie hodowli mikroorganizmów.

Materiały i metody

Warunki hodowli bakteryjnych

Materiał do badań stanowiły cztery szczepy bakteryjne należące do promieniowców (*Actinobacteria*): *Rhodococcus opacus* (89), *Rhodococcus rhodochrous* (202), *Rhodococcus* sp. (1) oraz *Rhodococcus opacus* (1069).

Hodowlę komórek bakteryjnych prowadzono w pożywce płynnej, stymulującej wytwarzanie flokulantów [Kurane i in., 1994]. Kolby Erlenmayera o pojemności 100 ml zawierające po 50 ml pożywki szczepiono 5 ml zawiesiny komórek odpowiedniego mikroorganizmu. Hodowlę prowadzono na wytrząsarce rotacyjnej przy obrotach 130 rpm, w temperaturze 26 °C przez 11 dni. Podczas trwania hodowli z każdej kolby pobierano (w warunkach jałowych) próbki do dalszych analiz. Wyniki przedstawione w pracy pochodzą z dwóch niezależnych hodowli prowadzonych w trzech powtórzeniach.

Otrzymywanie preparatów bioflokulantów

10-dniową hodowlę bakteryjną odwirowano (9 tys. rpm, 30 minut, 4 °C) w celu usunięcia komórek natomiast uzyskany supernatant strącano za pomocą etanolu w proporcji 2:1 i pozostawiono w temperaturze 4 °C na 24 godziny. Następnie całość odwirowano (9 tys. rpm, 30 minut, 4 °C), a otrzymany osad rozpuszczono w wodzie destylowanej. Preparat flokulantu dializowano przez 72 h w tempera-

turze 4 °C i po upływie tego czasu całość poddano procesowi liofilizacji, uzyskując wstępnie oczyszczone preparaty bioflokulantów z czterech szczepów bakteryjnych.

Metody analityczne

Aktywność flokulacyjną określano przez spektrofotometryczny pomiar absorbancji (550 nm) z zastosowaniem zawiesiny kaolinowej zawierającej bezwodny chlorek wapnia [Kurane i in., 1994].

Dodatkowo oznaczono stężenie cukrów całkowitych [Dubois i in., 1956], cukrów redukujących [Kłyszczko-Stefanowicz, 2003] oraz białek [Bradford, 1976] w płynie pohodowlanym, pobieranym w trakcie trwania hodowli.

Aktywność flokulacyjną (AF) obliczano za pomocą wzoru:

$$AF[\%] = \frac{A-B}{A} \cdot 100 \quad (1)$$

gdzie:

A – wartość absorbancji próby kontrolnej

B – wartość absorbancji próby badanej

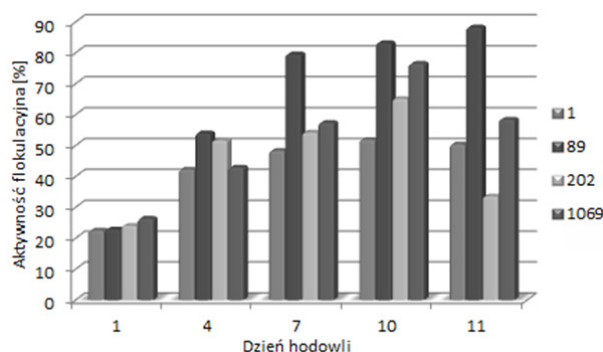
Wyniki i dyskusja

Głównym celem wykonanych doświadczeń było wybranie szczepu o najwyższej aktywności flokulacyjnej spośród dostępnych kolonii (Rys. 1). Przebadano hodowle czterech szczepów bakteryjnych (1, 89, 202, 1069), należących do rodziny *Nocardiaceae*.

Okazało się, że spośród analizowanych szczepów, najwyższą aktywność flokulacyjną wynoszącą 85% w 11. dniu hodowli, wykazywał płyn pohodowlany otrzymany z hodowli bakteryjnej 89.

Natomiast szczepy 1069 i 202 osiągały najwyższą aktywność flokulacyjną w 10. dniu hodowli, przy czym jej wartość procentowa utrzymywała się w granicach od 60% do 75%. Z kolei aktywność flokulacyjna szczepu 1 wynosiła maksymalnie 50% w 10. dniu hodowli.

Zróznicowanie aktywności flokulacyjnej w poszczególnych dniach hodowli analizowanych szczepów bakteryjnych świadczy o tym, że pomimo bliskiego pokrewieństwa filogenetycznego badane kolonie bakteryjne cechują się indywidualnymi cyklami przemian metabolicznych. Obserwuje się to szczególnie 7. dnia hodowli, w którym szczep 89 uzyskuje aktywność 78%, podczas gdy aktywność flokulacyjna pozostałych szczepów wynosi 45-55%.



Rys. 1. Aktywność flokulacyjna analizowanych szczepów bakteryjnych w czasie wzrostu na pożywce płynnej

Pomiary stężeń białka dla każdej hodowli w kolejnych dniach wzrostu mikroorganizmów przedstawiono w tab. 1. Otrzymane wartości sugerują, że istnieje zależność pomiędzy aktywnością flokulacyjną a stężeniem białka. Należy zwrócić uwagę na fakt, iż wszystkie badane hodowle bakteryjne wykazywały najwyższe stężenie białka w 10. dniu hodowli, czyli w tej samej dobie inkubacji, gdy aktywność flokulacyjna osiągnęła maksymalną wartość.

Tab. 1. Stężenie białka [µg/ml] w płynie pohodowlanym w kolejnych dniach hodowli

| Dzień hodowli | Szczep bakteryjny | | | |
|---------------|-------------------|-------|-------|-------|
| | 1 | 89 | 202 | 1069 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 37,9 | 10,5 | 51,9 | 10,3 |
| 4 | 37,9 | 33,2 | 87,6 | 27,9 |
| 7 | 79,5 | 107,1 | 130,9 | 101,7 |
| 10 | 101,7 | 141,1 | 160,9 | 138,4 |

W tab. 2 i 3 zaprezentowano stężenia cukrów całkowitych i redukujących w płynie pohodowlanym w poszczególnych dniach hodowli mikroorganizmów. Obserwuje się systematyczne zużycie glukozy zawartej w pożywce z początkowego stężenia $16 \pm 0,4$ mg/ml do średnio $3 \div 5$ mg/ml w przypadku 10. dnia hodowli. Zmniejszające się stężenie glukozy dla każdego z czterech analizowanych szczepów świadczy o intensywnym wzroście komórek bakteryjnych.

Tab. 2. Stężenie cukrów całkowitych [mg/ml] oznaczanych metodą fenolową w płynie pohodowlanym w kolejnych dniach hodowli

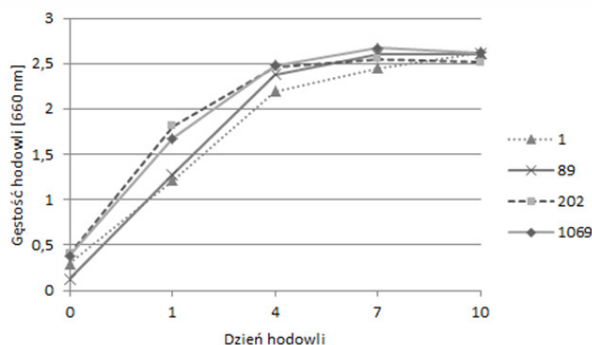
| Dzień hodowli | Szczep bakteryjny | | | |
|---------------|-------------------|------|------|------|
| | 1 | 89 | 202 | 1069 |
| 0 | 15,7 | 16,4 | 16,6 | 15,8 |
| 1 | 13,6 | 14 | 15,4 | 14,3 |
| 4 | 11,3 | 5,5 | 7,7 | 6,2 |
| 7 | 7,6 | 4,1 | 4,9 | 4,1 |
| 10 | 7,5 | 3,9 | 4,3 | 2,5 |

Tab. 3. Stężenie cukrów redukujących [mg/ml] oznaczanych metodą Somogyi-Nelsona w płynie pohodowlanym w kolejnych dniach hodowli

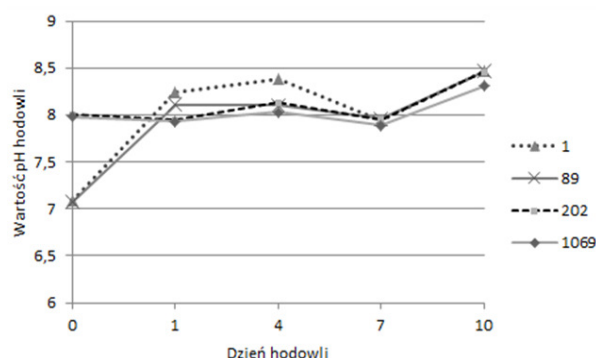
| Dzień hodowli | Szczep bakteryjny | | | |
|---------------|-------------------|-----|-----|------|
| | 1 | 89 | 202 | 1069 |
| 0 | 8,4 | 7,6 | 7,5 | 8,5 |
| 1 | 7,7 | 6,2 | 5,7 | 8,3 |
| 4 | 5,8 | 4,6 | 3,1 | 3,9 |
| 7 | 5,2 | 2,8 | 2,9 | 2,5 |
| 10 | 4,8 | 2,5 | 2,9 | 1,6 |

W pomiarach gęstości hodowli (Rys. 2) nie widać różnic w zużyciu podstawowego źródła węgla w pożywce oraz zmiennej wartości aktywności flokulacyjnej w obrębie analizowanych szczepów. Można zaobserwować zbliżone wartości absorbancji w kolejnych dniach hodowli mikroorganizmów świadczące o tym, że ilość bakterii rozmnażających się wykładniczo jest podobna, pomimo zastosowania różnych szczepów. Faza wykładnicza trwa do 4. dnia hodowli w przypadku każdego szczepu, po czym obserwujemy powolne przechodzenie do fazy stacjonarnej, w której nie zachodzą już podziały komórkowe, a tym samym nie obserwuje się wzrostu liczby komórek bakteryjnych.

Natomiast analizując dane przedstawione na rys. 3. można zauważyć, że wszystkie badane hodowle bakteryjne charakteryzują się wartościami *pH* hodowli zbliżonymi do zasadowego. Wartość *pH* hodowli szczepów 1069 i 202 w ciągu całego okresu inkubacji



Rys. 2. Gęstość hodowli poszczególnych szczepów w kolejnych dniach wzrostu na pożywce A



Rys. 3. Wartość *pH* hodowli poszczególnych szczepów

oscyluje w granicach 8, z kolei w przypadku szczepów 1 i 89 obserwuje się wzrost wartości *pH* z początkowej wartości wynoszącej 7 do 8,5 w 10. dniu hodowli.

Przeprowadzone hodowle pozwoliły na ustalenie optymalnego czasu inkubacji, w którym aktywność flokulacyjna danego szczepu jest najwyższa.

Dalszy etap badań stanowiła izolacja polimeru zewnątrzkomórkowego z płynu pohodowlanego. W tym celu zastosowano powszechnie używaną metodę strąceniową za pomocą etanolu, a otrzymany osad bioflokulantu poddano następnie dializie i liofilizacji otrzymując preparaty wstępnie oczyszczonych liofilizatów dla każdego z badanych szczepów bakteryjnych. Przygotowane roztwory bioflokulantów o stężeniu 1 mg/ml zanalizowano pod względem aktywności flokulacyjnej.

Na podstawie wyników zebranych w tab. 4, stwierdzono, że proces oczyszczania nie wpływa znacząco na aktywność flokulacyjną otrzymanych preparatów bioflokulantów. Dodatkowo zaobserwowano zależność pomiędzy masą uzyskanych bioflokulantów a ich aktywnością flokulacyjną. W przypadku każdego z analizowanych szczepów, stwierdzono, że im wyższa aktywność flokulacyjna tym więcej preparatu bioflokulantu otrzymano po procesie oczyszczania. Tak jak w przypadku analiz płynu pohodowlanego, najwyższą aktywnością charakteryzuje się preparat bioflokulantu syntetyzowany przez szczep *Rhodococcus opacus* (89).

Tab. 4. Porównanie liofilizatów otrzymanych z poszczególnych szczepów

| Parametr | Szczep bakteryjny | | | |
|--|-------------------|----|-----|------|
| | 1 | 89 | 202 | 1069 |
| Aktywność flokulacyjna [%] | 63 | 76 | 72 | 70 |
| Masa flokulantów uzyskana ze 100 ml płynu pohodowlanego [mg] | 43 | 96 | 60 | 52 |

Wnioski

Analizując wyniki otrzymane w przeprowadzonych doświadczeniach można stwierdzić, że szczepy bakteryjne należące do *Actinobacteria* wykazują zdolności flokulacyjne o zróżnicowanych aktywnościach. Szczególnie należy zwrócić uwagę na wysoką aktywność szczepu 89, która w przypadku płynu pohodowlanego wynosi 85% i co istotne, otrzymany preparat nie traci w znaczący sposób aktywności flokulacyjnej w wyniku kolejnych etapów oczyszczania. W przypadku tego szczepu otrzymano największą ilość preparatu bioflokulantu w przeliczeniu na 100 ml płynu pohodowlanego.

LITERATURA

Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Bioch.*, 72, nr 1, 248-254. DOI:10.1006/abio.1976.9999

Brathby J., 2006. Coagulation and flocculation in water and wastewater treatment. IWA Publishing, Londyn

Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Anal. Chem.*, 28, nr 3, 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017

Kłyszczko-Stefanowicz L., 2003. Ćwiczenia z biochemii. PWN, Warszawa

Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T., Kiyohara M., Hirano M., Taniguchi Y., 1994. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols *Biosci., Biotech. and Biochem.*, 58, nr 3, 428-429. DOI: 10.1271/bbb.58.428

Lee C. S., Robinson J., Chong M. F., 2014. A review on application of flocculants in wastewater treatment *Process Saf. Environ.*, 92, nr 6, 489-508. DOI: 10.1016/j.psep.2014.04.010

Praca współfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu badawczego DEC-2012/07/B/ST5/01799.