

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Możliwości zastosowania grzybów z rodzaju *Rhizopus* do oczyszczania wybranych ścieków przemysłu skrobiowego

Jacek Nowak, Barbara Górna, Małgorzata Lasik

UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Zakład Fermentacji i Biosyntezy

STRESZCZENIE

W pracy podjęto próbę wykorzystania czterech szczepów grzybów strzępkowych *Rhizopus oligosporus* do biodegradacji ścieków z przemysłu krochmalniczego po uprzednim przetestowaniu ich na podłożu modelowym imitującym ścieki ziemniaczane. Do oczyszczania ścieków zastosowano mikroorganizmy, które posiadają szerokie zastosowanie do produkcji żywności fermentowanej i są bezpieczne dla organizmu ludzkiego jak i dla środowiska.

Application of *Rhizopus* fungi for biodegradation of starch industry wastewaters

ABSTRACT

The study attempts to use four strains of *Rhizopus oligosporus* for biotreatment of wastewater from potato starch industry. First the strains were tested on model medium imitating potato wastewater and then on industrial wastes. The *Rhizopus* mold applied in the experiments is widely used in the production of fermented foods and is recognized as safe for humans and the environment.

1. WSTĘP

Grzyby strzępkowe (nitkowe, mikroskopowe) potocznie zwane pleśniami należą do grupy drobnoustrojów o istotnym znaczeniu gospodarczym. Spełniają ważną rolę w życiu codziennym człowieka, a ich działalność jest dwojakiego rodzaju. Negatywna działalność wynika ze strat na skutek rozwoju pleśni na surowcach spożywczych oraz na żywności nieprawidłowo przechowywanej. Wyposażone w enzymy hydrolityczne powodują rozkład białek, tłuszczów oraz innych składników, obniżając wartość odżywczą żywności [1, 2].

Pozytywna rola grzybów nitkowych w działalności gospodarczej człowieka wynika ze zdolności do wytwarzania wielu enzymów i związków, które znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, włókienniczym i wielu innych dziedzinach przemysłu biotechnologicznego [3]. Jako chemoorganotrofy do wzrostu i rozmnażania pleśnie wymagają obecności organicznych związków będących źródłem węgla i energii. Enzymy grzybów wydzielane do środowiska rozkładają wielkocząsteczkowe związki do form prostych przyswajalnych przez komórki grzybni [4].

Zastosowanie grzybów mikroskopowych po produkcji żywności polega bardzo często do nadawania wyrobom specyficznych cech sensorycznych i reologicznych. Pleśnie znalazły zastosowanie w produkcji serów (*Penicillium* i *Geotrichum*) i w produkcji żywności fermentowanej w krajach Południowo-Wschodniej Azji [5].

Należy pamiętać, że podstawowym wymogiem stawianym wszystkim mikroorganizmom wykorzystywanym na cele spożywcze i przemysłowe jest ich udokumentowane całkowite bezpieczeństwo dla zdrowia człowieka. Powinny być one również nieszkodliwe dla środowiska, szczególnie dla zwierząt i roślin [6].

Przemysł spożywczy w Polsce zużywa znaczące ilości wody, produkując w konsekwencji dużą ilość ścieków o bardzo zmiennym składzie. Zakłady branży spożywczej są zazwyczaj źródłem ścieków o dużym ładunku zanieczyszczeń, o różnym charakterze i rozmiarach, obejmujących takie grupy jak substancje rozpuszczone, substancje koloidalne lub zawiesiny, reprezentowane przez związki organiczne (białko, tłuszcze) i nieorganiczne (chlorki, azotany, siarczany, fosforany i inne) [7].

Jakość i zróżnicowanie ścieków wytwarzanych w zakładach branży przetwórstwa ziemniaka zależy od profilu i produkcji w konkretnym zakładzie oraz od wykonywanych procesów przetwórczych. Najważniejszymi wskaźnikami zanieczyszczeń

w ściekach z zakładów przetwórstwa ziemniaka i produkcji skrobi są: ChZT, zawiesiny, azot i fosfor. Ścieki przemysłu ziemniaczanego produkującego skrobię charakteryzują się znacznym obciążeniem sięgającym 33,2 g O₂/L dla ścieku odbiałczanego, 20,4 g O₂/L dla ścieku skrobiowego [8].

Grzyby *Rhizopus oligosporus* mają zastosowanie w produkcji żywności fermentowanej typu tempeh [9]. Grzyb ten jest zdolny do rozkładu skrobi. W związku z tym istnieje możliwość zastosowania go do biodegradacji ścieków zawierających w swoim składzie skrobię. Jednak badania dotyczące tych możliwości są nieliczne.

W literaturze światowej i krajowej brak jest danych dotyczących wykorzystania grzybów strzępkowych do oczyszczania zarówno ścieków technologicznych z krochmalni jak i ścieków z kwasowo – termicznego wydzielenia białka z wód sokowych, postanowiono, więc sprawdzić możliwości ich użycia do procesów biodegradacji.

2. MATERIAŁY I METODY

2.1. Materiał badawczy

2.1.1. Stosowane drobnoustroje

Do badań zostały wykorzystane cztery szczepy pleśni *Rhizopus oligosporus* pochodzące z Northern Regional Research Laboratory (Peoria, USA):

- *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710
- *Rhizopus oligosporus* NRRL 6495
- *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905
- *Rhizopus oligosporus* NRRL 2549.

Pleśnie namnażano na podłożu glukozowo-ziemniaczano agarowym (PDA) w temperaturze 37°C przez 48-72 godz.

2.1.2. Stosowane podłoża

W pracy w celu wyboru szczepów najbardziej przydatnych do biodegradacji ścieków zawierających w swoim składzie skrobię zastosowano podłoże modelowe imitujące ścieki skrobiowe. Skład tego podłoża był następujący: skrobia rozpuszczalna w ilości 10,0 g/L, pepton małosolny 5,0 g/L, KH₂PO₄ – 0,2 g/L, MgSO₄*7H₂O – 0,2 g/L.

Materiałem badawczym stosowanym w drugim etapie badań były ścieki pochodzące z Wielkopolskiego Przedsiębiorstwa Przemysłu Ziemniaczanego w Stawach koło Poznania. Pierwszym rodzajem stosowanego ścieku w badaniach był ściek pobrany ze stacji odzyskiwania białka z wód sokowych ziemniaków (ściek odbiałczony). Powstaje on w procesie wytrącania białka z wód sokowych w wyniku

przeprowadzenia koagulacji kwasowo-termicznej. Drugim rodzajem stosowanego ścieku był ściek powstający w procesie produkcji skrobi ziemniaczanej (ściek skrobiowy).

2.1.3. Warunki hodowli

• Hodowle wytrząsane

Sterylnie podłoża modelowe z pH wyjściowym uregulowanym do poziomu 4,0 i 5,0 zaszczepiono inokulum *Rhizopus oligosporus*. Inokulum stanowił zmyw ze skosów PDA w ilości 10% objętościowych podłoża hodowlanego. Hodowle wytrząsane prowadzono w kolbach Erlenmayera (150 rpm). Kolby zawierały po 100ml podłoża hodowlanego. Czas hodowli wynosił odpowiednio 24h, 48h i 72h (temp 37°C).

W przypadku zastosowania ścieków pochodzących z przemysłu ziemniaczanego zastosowano identyczne warunki hodowli w kolbach jak podczas prowadzenia hodowli wytrząsanych na podłożu modelowym.

• Hodowle fermentorowe

Dla ścieku odbiałzanego przeprowadzono szereg hodowli z użyciem bioreaktora laboratoryjnego Biostat B. (Braun, Niemcy) (Rys. 1). Procesy biode-

gradacji w bioreaktorze prowadzono w następujących warunkach:

- pojemność robocza 1,5 L ścieku
- napowietrzanie – 2 L powietrza/minutę
- mieszanie – 120 rpm
- bez regulacji pH
- temperatura 37°C.

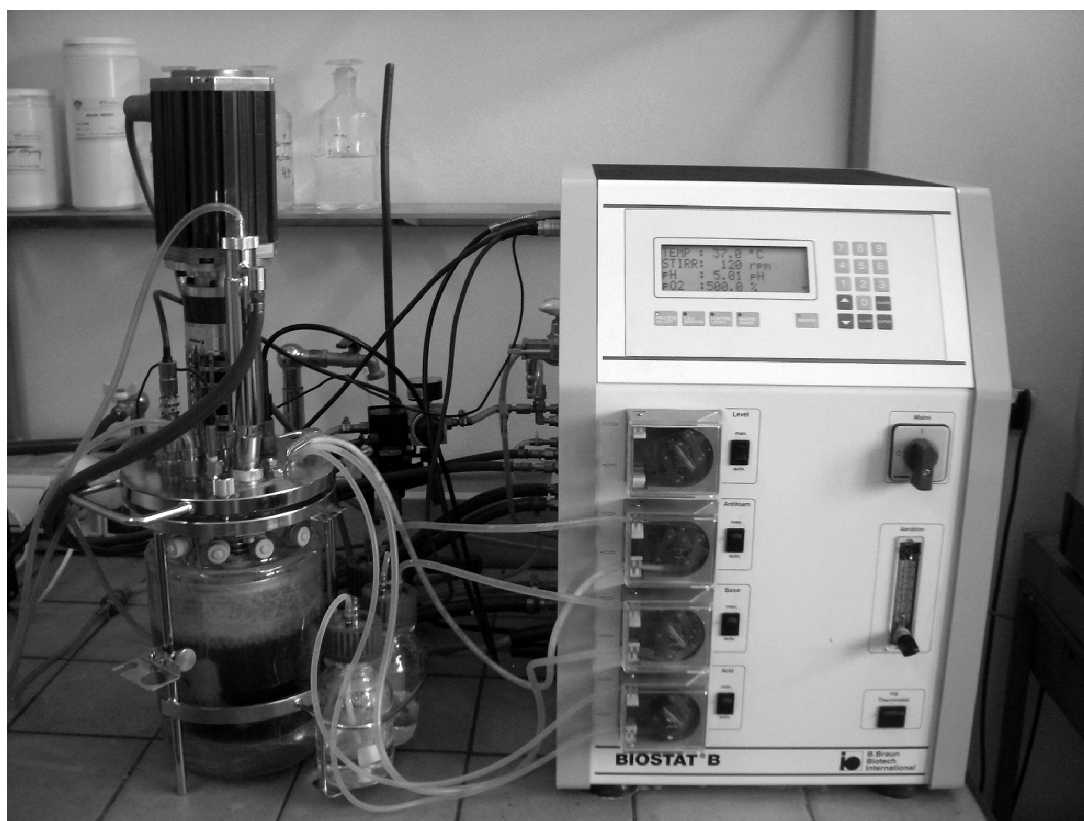
Ściek sterylizowano wraz z naczyniem fermentacyjnym w autoklawie, w temperaturze 121°C przez 40 minut. Po ostygnięciu, ściek zaszczepiono inokulum w ilości 10% objętościowych i rozpoczynano proces oczyszczania. Inokulum stanowił 24 godzinna hodowla poszczególnych szczepów grzybów z rodzaju *Rhizopus*.

2.2. Metody analityczne

Oznaczenia poprzedzone były oddzieleniem biomasy i osadów poprzez wirowanie przy 3000 obr/min. przez 10 min.

W supernatancie wykonano następujące oznaczenia:

- Substancje redukujące wprost,
- Chemiczne Zapotrzebowanie Tlenu (ChZT),
- Zawartość suchej substancji.



Rysunek 1. Bioreaktor laboratoryjny Biostat B w czasie oczyszczania ścieków.

2.2.1. Oznaczanie substancji redukujących

Zawartość substancji redukujących w przeliczeniu na glukozę oznaczono metodą z kwasem 3,5DNS [10].

2.2.2. Oznaczenie Chemicznego Zapotrzebowania Tlenu (ChZT)

Pomiar ChZT wykonano przy użyciu testów kuwetowych na fotometrze spektralnym Cadas 30s firmy dr Lange testem LCK 014 [14].

2.2.3. Oznaczanie suchej substancji

Suchą substancję oznaczano metodą suszarkową a wydajność tworzącej się biomasy grzybowej wyrażono w gramach suchej substancji na 1L podłoża hodowlanego (g s.s/L).

3. Dyskusja i omówienie wyników

3.1. Ocena zdolności wykorzystania skrobi przez badane szczepy grzybów strzępkowych na podłożu modelowym

Pierwszy etap badań polegał na określeniu dynamiki wykorzystania skrobi zawartej w podłożu oraz ocenie ilości tworzącej się biomasy grzybowej w czasie biodegradacji podłoża modelowego imitującego ścieki przemysłu ziemniaczanego.

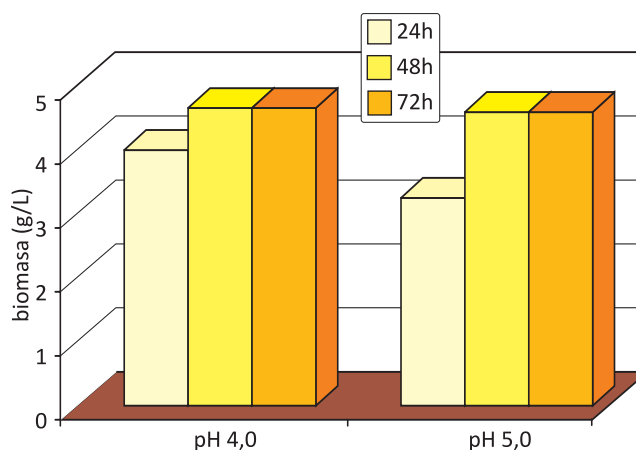
Zróznicowane pH wyjściowe podłoża miało na celu poszukiwanie pH właściwego dla rozwoju i wzrostu poszczególnych szczepów pleśni.

Wykorzystanie skrobi na poziomie ponad 90% zaobserwowano już po 24 godzinach hodowli (zawartość wyjściowa 8,2 g/L podłoża). Najintensywniej w tym czasie wykorzystał skrobię szczep *R. oligosporus* 2549 na podłożu o pH wyjściowym 4,0 – 97%. Po 24h obserwowano również wysokie zużycie skrobi przez szczepy *R. oligosporus* 2710, 6495 i 5905 (odpowiednio 94,69%, 93,21%, 93,27%). Najniższym zużyciem skrobi z podłoża modelowego po 24 godzinach

hodowli charakteryzował się szczep *R. oligosporus* 2549 na podłożu o pH wyjściowym 5,0 (88,7%). Po 72h hodowli wykorzystanie skrobi przez wszystkie cztery szczepy *R. oligosporus* było zbliżone i wyniosło od 94 do 98% (Tab. 1).

Re i współpracownicy wykazali, że szczep *R. oligosporus* ATCC 22959 zdolny jest do całkowitego wykorzystania skrobi (10,0 g/L) z podłoża o pH wyjściowym 4,0 w ciągu 20 godzin hodowli wytrząsanych w 37°C [10].

Stwierdzono, że pH podłoża hodowlanego wpływa na wykorzystanie substratu oraz na wzrost mikroorganizmów. Trzy spośród czterech testowanych szczepów *Rhizopus oligosporus* rozwijały się szybciej na podłożu modelowym o pH uregulowanym na początku hodowli do poziomu 4,0. Najbardziej dynamicznie wzrastał szczep *R. oligosporus* 2710. Po 24 h hodowli wytworzył on największą ilość biomasy pleśniowej 4,0 g s.s/L podłoża (Rys. 2).

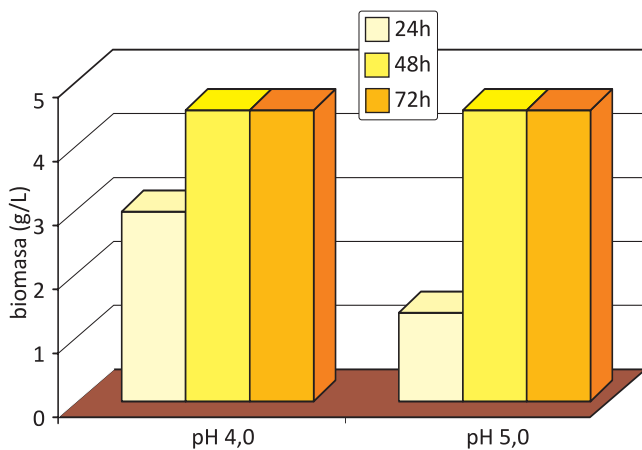


Rysunek 2. Przyrost biomasy w czasie 72h hodowli na podłożu modelowym (*R. oligosporus* 2710)

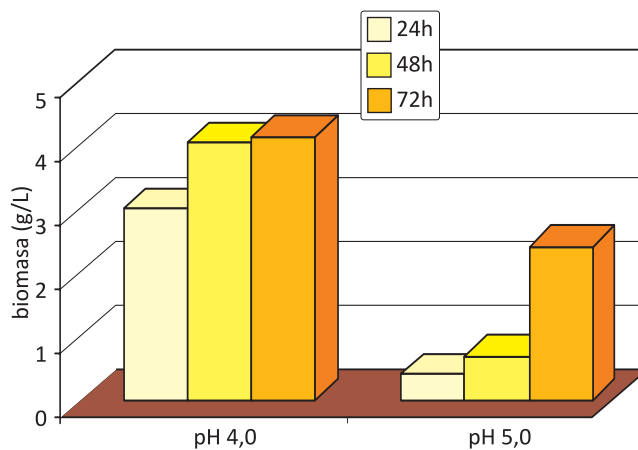
Po 48 godzinach hodowli ilość biomasy uzyskanej podczas hodowli *R. oligosporus* 5905 (4,60 g s.s/L) (Rys. 3) zrównała się z ilością biomasy szczepu *R. oligosporus* 2710 (4,65 g s.s/L).

Tabela 1. Wykorzystanie skrobi w czasie hodowli 4 szczepów *R. oligosporus* na podłożu modelowym o początkowym pH 4,0 i 5,0

pH	Czas hodowli [h]	Wykorzystanie skrobi [%]			
		2710	2549	5905	6495
4,0	24	94,70	97,10	93,27	93,21
	48	97,90	97,53	95,19	94,57
	72	97,90	97,60	95,74	94,81
5,0	24	97,90	88,70	91,00	94,07
	48	97,84	89,39	95,60	95,06
	72	98,14	98,15	96,24	95,20

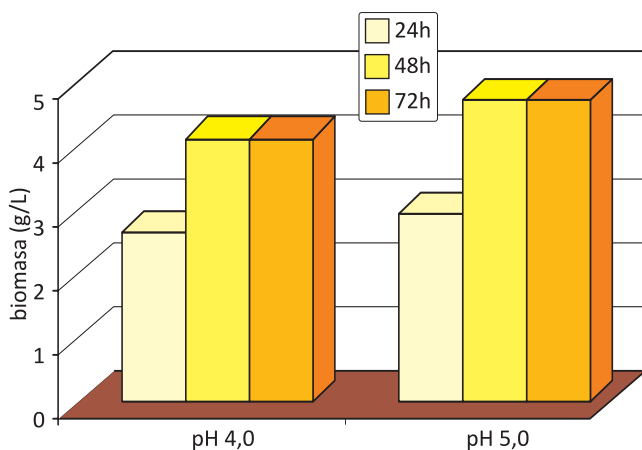


Rysunek 3. Przyrost biomasy w czasie 72h hodowli na podłożu modelowym (*R. oligosporus* 5905)



Rysunek 5. Przyrost biomasy w czasie 72h hodowli na podłożu modelowym (*R. oligosporus* 2549)

Podłoże o pH 5,0 okazało się korzystniejsze dla wzrostu szczepu *R. oligosporus* 6495, ilość wytworzonej biomasy po 48 h hodowli wyniosła 4,80 g s.s/L (Rys. 4), czyli nieznacznie przewyższyła najwyższą ilość biomasy wytworzonej na podłożu modelowym o pH wyjściowym 4,0 (4,65 g s.s/L dla szczepu *R. oligosporus* 2710).



Rysunek 4. Przyrost biomasy w czasie 72h hodowli na podłożu modelowym (*R. oligosporus* 6495)

Jednak szczep *R. oligosporus* 6495 na podłożu o pH 5,0 po 24h hodowli wytworzył mniej biomasy (3,0 g s.s/L) niż szczepy dobrze wzrastające na podłożu o pH 4,0. Najślabszym wzrostem charakteryzował się szczep *R. oligosporus* 2549. Testowany szczep po 72h hodowli charakteryzował się dużo słabszym wzrostem na podłożu o pH 5,0 niż na podłożu o pH 4,0 – wytworzył tylko 2,45 g s.s/L biomasy w jednym litrze podłoża (Rys. 5).

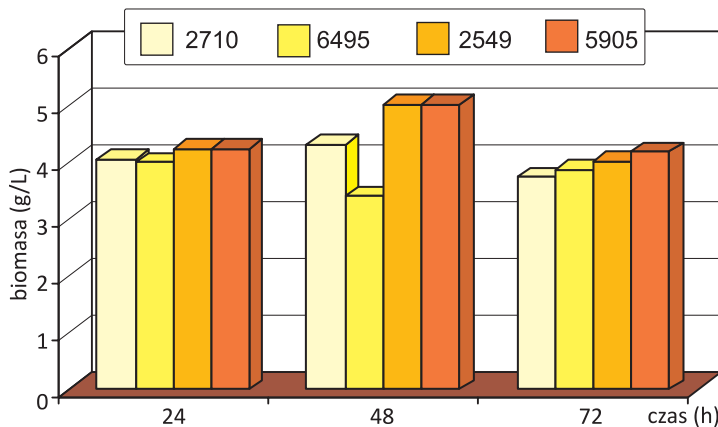
Jin i współpracownicy zauważyli istotny wpływ pH początkowego hodowli na wzrost grzyba *R. oligosporus* DAR 2710. Za optymalne dla testowanego szczepu grzyba uznali pH=4,0 [9]. Również Re i współpracownicy testując szczep *R. oligosporus* ATTC 22959 stwierdzili najintensywniejszy wzrost na podłożu o pH wyjściowym 4,0 [10].

3.2. Ocena zdolności wykorzystania skrobi przez badane szczepy grzybów strzępkowych na ściekach zawierających w swoim składzie skrobię

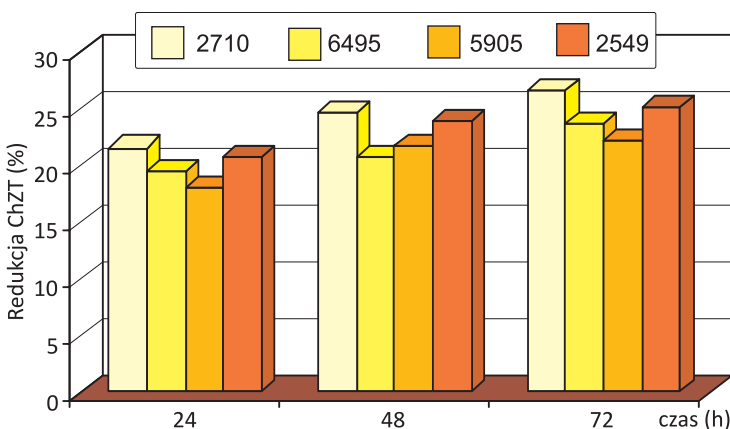
Zastosowany do procesu biodegradacji ściek odbiałczony charakteryzował się znacznie wyższym obciążeniem niż ściek skrobiowy. Chemiczne zapotrzebowanie tlenu sięgnęło 35000 mg O₂/L dla ścieku odbiałczonego i było prawie trzy razy niższe dla ścieku skrobiowego (13430 mg O₂/L). Ściek odbiałczony zawierał również zdecydowanie więcej substancji redukujących, które mogły być podstawą do tworzenia znacznej ilości biomasy. Sucha substancja wynosiła 47,2 g/L dla ścieku odbiałczonego i tylko 13,1 g/L dla skrobiowego. Dla obu ścieków przeprowadzono szereg hodowli wytrząsanych, w których zastosowano obroty 150 rpm, temperaturę 37°C. Czas hodowli wyniósł 72h.

Najważniejszymi elementami oceny procesu biodegradacji w warunkach wytrząsanych były zmiany: chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) i przyrosty biomasy. Wartości tych parametrów były zbliżone do siebie, przy zastosowaniu obu wariantów pH podłoża. Sugerując się wysokimi kosztami regulacji pH ścieków w zastosowaniu przemysłowym, zdecydowano się na przeprowadzanie kolejnej części badań z zastosowaniem podłoża bez regulacji pH (pH początkowe ścieków było zbliżone do pH 5,0).

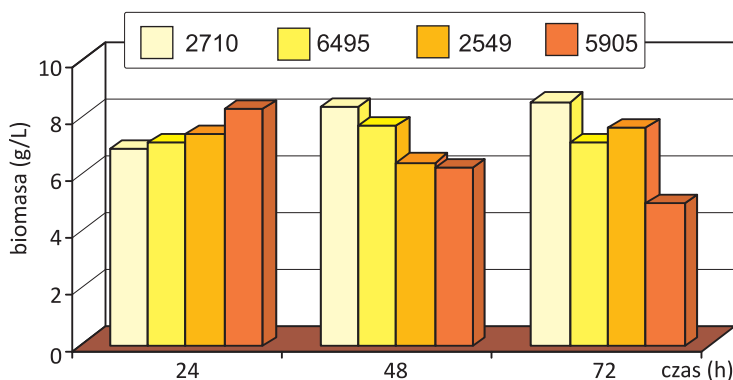
Ściek odbiałczony charakteryzujący się znacznie wyższym obciążeniem okazał się bardziej podatny na procesy biodegradacji przy użyciu grzybów strzępkowych *R. oligosporus*. Ilości wytworzonej biomasy w poszczególnych hodowlach na ścieku odbiałczonym różniły się dla zastosowanych szczepów *R. oligosporus*. Najwięcej grzybni wytworzył szczep *R. oligosporus* 2710. Natomiast szczep *R. oligosporus* 5905 wykazał się najbardziej dynamicznym wzrostem na ścieku odbiałczonym po 24 godzinach, po czym ilość wytworzonej przez niego biomasy zmniejszyła się przy przedłużeniu hodowli do 72 godzin (Rys. 6).



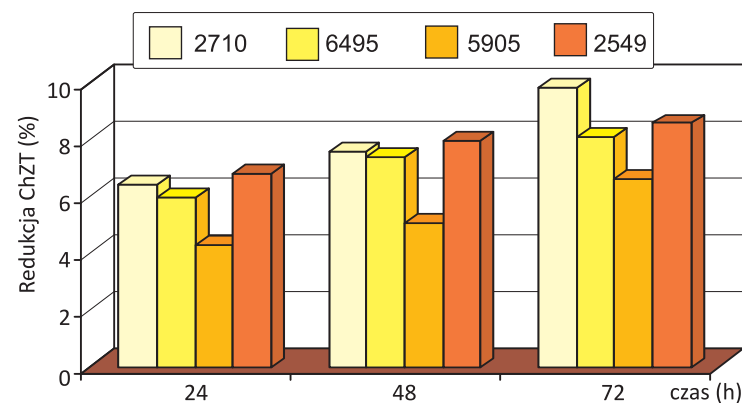
Rysunek 6. Przyrost biomasy grzybowej 4 szczepów *R. oligosporus* podczas hodowli na ścieku skrobiowym w warunkach wytrząsanych



Rysunek 7. Redukcja wskaźnika ChZT ścieku skrobiowego w czasie 72h hodowli w warunkach wytrząsanych



Rysunek 8. Przyrost biomasy grzybowej 4 szczepów *R. oligosporus* podczas hodowli w ścieku odbiałczanym w warunkach wstrząsanych



Rysunek 9. Redukcja wskaźnika ChZT ścieku odbiałczanego w czasie 72h hodowli w warunkach wstrząsanych

Wszystkie testowane szczepy grzyba charakteryzowały się bardzo słabym wzrostem na ścieku skrobiowym. Również redukcja wskaźnika (ChZT) w czasie wzrostu grzybów na ścieku skrobiowym była niewielka. Najwyższą redukcją wykazał się szczep 2710 (26,84%), a najniższą szczep 5905 - 22,43%, po 72 godzinach hodowli (Rys. 7).

Inaczej redukcja wskaźnika ChZT przedstawiała się podczas hodowli grzybów strzępkowych na ścieku „odbiałczanym”. Po 72 godzinach hodowli wyniosła ona: dla szczepu *R. oligosporus* 2710 – 48,73%; *R. oligosporus* 2549 – 42,45%; *R. oligosporus* 6495 – 40,05%, *R. oligosporus* 5905 – 32,74%.

Przebieg zmian ChZT i ilość wytworzonej biomasy dla poszczególnych szczepów obrazują poniższe Rysunki 8 i 9.

Ponieważ ściek skrobiowy bardzo słabo poddawał się procesom biodegradacji przy użyciu grzybów strzępkowych *Rhizopus oligosporus* do badań w warunkach bioreaktorowych wykorzystano ściek odbiałczony.

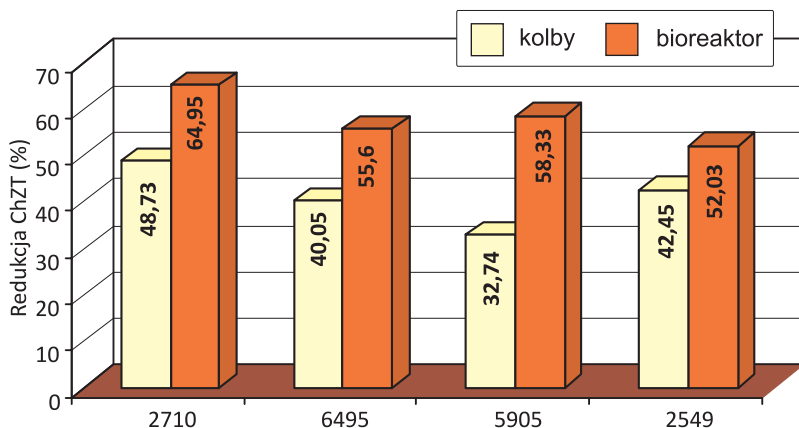
3.2. Porównanie hodowli grzybów strzępkowych *Rhizopus oligosporus* na ścieku odbiałczanym w warunkach wstrząsanych i bioreaktorowych

Podczas hodowli w bioreaktorze uzyskano wyższą redukcję obciążenia ścieku niż we wcześniej przeprowadzonych hodowlach wytrząsanych. Najwyższa redukcja wskaźnika ChZT wyniosła dla szczepu *R. oligosporus* 2710 65% po 72 godzinach hodowli (zwiększyła się w porównaniu z hodowlą wytrząsaną o około 16%). Spośród testowanych szczepów *Rhizopus oligosporus* najmniej przydatnym do biodegradacji ścieku przemysłowego okazał się szczep *R. oligosporus* 5905. Redukcja wskaźnika ChZT wyniosła dla niego 52% po 72 godzinach hodowli, co i tak jest wynikiem o 19% lepszym od uzyskanego w hodowli wytrząsanej prowadzonej dla tego szczepu (Rys. 10).

Uzyskane wyniki wskazują, na duże możliwości biodegradacyjne pleśni, szczególnie przy zachowaniu możliwie intensywnego napowietrzania jak to miało miejsce w bioreaktorze.

Jin i współpracownicy stwierdzili, że *Rhizopus oligosporus* DAR 2710 zdolny jest do redukcji 97% ChZT w ściekach przemysłowych pochodzących z krochmalni.

Testowane szczepy pleśni charakteryzowały się zróżnicowanym wzrostem grzybni i dynamiką wzrostu na podłożu ściekowym. Po zakończeniu



Rysunek 10. Porównanie redukcji wskaźnika ChZT w ścieku odbiałczanym przy użyciu 4 szczepów grzybów strzępkowych *R. oligosporus* w hodowlach wstrząsanych i bioreaktorowych

hodowli (72h) i starannym oddzieleniu wytworzonej grzybni (również z metalowych elementów fermentora) otrzymano około 11g suchej biomasy grzybowej na 1L podłoża hodowlanego dla szczepu *R. oligosporus* 2549, tzn. więcej niż w czasie hodowli prowadzonych przez Jin i współpracowników [12].

4. PODSUMOWANIE

Przy zastosowaniu podłoża modelowego 48 godzin biodegradacji skutkowało wykorzystaniem przez grzyby od 89 – 98% skrobi obecnej w podłożu przy wytworzeniu od 1,4 do 4,8 g biomasy z 1 litra. Początkowe pH=4,0 podłoża okazało się korzystniejsze niż 5,0 dla wzrostu testowanych szczepów grzybów.

Ściek odbiałczony okazał się bardziej podatny na procesy biodegradacji przy użyciu grzybów niż ściek skrobiowy.

W hodowlach bioreaktorowych uzyskano wyższy stopień oczyszczenia ścieku odbiałczanego (od 48 – 65%) aniżeli w hodowlach wstrząsanych (40-48%).

Spośród testowanych szczepów najbardziej skuteczny w biodegradacji ścieków przemysłu krochmalniczego okazał się *R. oligosporus* 2710.

Metoda biodegradacji ścieków przemysłu spożywczego z użyciem grzybów strzępkowych może być rozpatrywana jako alternatywna metoda podczyszczania ścieków wysokoobciążonych.

LITERATURA

- [1] Libudzisz Z., Kowal K. (2000) Mikrobiologia techniczna, Tom I, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź.
- [2] Libudzisz Z., Kowal K. (2000) Mikrobiologia techniczna. Tom II, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź.
- [3] Jałosińska M. (2006) Mikrobiologia żywności. PWN, Warszawa.
- [4] Schlegel H. G. (2000) Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [5] Nowak J. (2006) Żywność fermentowana kuchniach różnych narodów. W: Mikroorganizmy w żywności i żywieniu (pod red. Gawęcki J. i Libudzisz Z.) Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu, 81-93.
- [6] Żakowska Z., Sobińska H. (2000) Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź.
- [7] Konieczny P., Szymański M. (2005) Ścieki przemysłu spożywczego- charakterystyka, zagrożenia, korzyści. Informator ekonnet.pl: Firma i Środowisko 10/05.
- [8] Lasik M., Nowak J., (2007) Effect of pollution load and oxygen availability on thermophilic aerobic continuous biodegradation of potato processing wastewater. Engineering in Life Sciences, 7(2), 187-191.
- [9] Nowak J., Szegotko K., (1992) Some biochemical changes during soybean and pea tempeh fermentation, Food Microbiology, 9, 37-43.
- [10] Muller G.L., (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31/3, 426-428.
- [11] Re G., Giacomo G., Spera L., Veglio F., (2003) Integrated approach in the biotreatment of starch wastes by *Rhizopus oligosporus*: kinetic analysis. Desalination 156, 389-396.
- [12] Jin B., Van Leeuwen J., Patel B., Doelle H. W., Yu Q. (1999) Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. Process Biochemistry 34, 59-65.
- [13] Jin B., Yan X. Q., Nan Leeuwen J. (2002) A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. Advances in Environmental Research 6, 179-189.
- [14] Tomczak E., Nowak J., Czarnecki Z., (2002) Przydatność testów kuwetowych do analizy składu i obciążenia ścieków przemysłu spożywczego. Aparatura Badawcza i Dydaktyczna: tom VII nr 1, 143-149.