



## Wpływ substratu na zmiany aktywności lipolitycznej i parametry osadu czynnego

Anna Wiechetek<sup>1</sup>, Jolanta Turek-Szytow<sup>1</sup>, Dariusz Choiński<sup>2</sup>, Marek Georgi<sup>3</sup>, Korneliusz Miksch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, Gliwice

<sup>2</sup>Instytut Automatyki, Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki, Politechnika Śląska, Gliwice

<sup>3</sup>Internationales Hochschulinstitut Zittau, Zittau

### Influence of substrate on fluctuation of lipolytic activity and parameters of activated sludge

#### Summary

Lipids are important and burdensome organic constituents of most wastewater. The amount of lipids in municipal wastewater is approximately 30-40% of the total organic matter, measured as chemical oxygen demand (COD). Lipids can form oil films on the surface of activated sludge flocks, preventing the diffusion of oxygen and causing problems in the pumping and aeration systems with development of filamentous microorganisms. The current practice to improve the biodegradation of lipids is bioaugmentation, with the addition of microorganisms or enzyme preparations for wastewater treatment.

Influence of substrate on fluctuation of lipolytic activity and parameters of activated sludge were studied. The activated sludge was bred from biological uses to bioaugmentation process. Enzymatic activities of activated sludge formed the schema: first, the maximum of lipolytic activity with respirometric activity were observed, next, the highest was dehydrogenases activity. It could be caused by a change of the metabolic path in *Pseudomonas fluorescens* cells, which includes replacement of TCA cycle by glyoxylate cycle. This replacement requires higher metabolic energy, so high lipolytic activity was connected with respirometric activity. The influence of pH on enzymatic activity of activated sludge was studied. The most effective method to remain stable pH in the chamber of reactor (6,5 – 7,0) was buffered inflow with  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ .

#### Adres do korespondencji

Anna Wiechetek,  
Katedra Biotechnologii  
Środowiskowej,  
Wydział Inżynierii  
Środowiska i Energetyki,  
Politechnika Śląska,  
ul. Akademicka 2,  
44-100 Gliwice;  
e-mail:  
Anna.Wiechetek@polsl.pl

#### biotechnologia

3 (82) 159–173 2008

#### Key words:

activated sludge, bioaugmentation, lipolytic activity.



## 1. Wstęp

W wyniku postępującego rozwoju cywilizacyjnego, obserwuje się zwiększenie ładunku zanieczyszczeń ścieków doprowadzanych do oczyszczalni. Istotny i równocześnie niezwykle uciążliwy składnik ścieków stanowią lipidy (1). Powodują one trudności w eksploatacji oczyszczalni, gdyż na skutek osadzania się w rurociągach zmniejszają drożność kanałów (2). Ponadto niekorzystnie wpływają na mikroorganizmy osadu czynnego, bowiem oblepiając kłaczki, utrudniają dostęp tlenu i substratów pokarmowych (3). Dodatkowo wysokie stężenie lipidów może stymulować rozwój bakterii nitkowatych, które przyczyniają się do zjawiska puchnięcia osadu czynnego (4).

Stosowane obecnie metody mechanicznego bądź chemicznego usuwania lipidów ze ścieków często są mało efektywne, a powstające osady wymagają dodatkowej utylizacji (5). Z tego powodu szczególną uwagę zwrócono na technologie oczyszczania wykorzystujące naturalny potencjał mikroorganizmów. Rozkład lipidów zawartych w ściekach następuje dzięki lipazom wytwarzanym przez mikroflorę osadu czynnego. Enzymy te katalizują reakcję hydrolizy, w wyniku której powstają m.in. kwasy tłuszczowe wykorzystywane przez mikroorganizmy jako substrat pokarmowy (6,7).

Zwiększenie wydajności osadu czynnego można uzyskać wpływając na jego metabolizm poprzez zastosowanie bioaugmentacji. Proces bioaugmentacji polega na wprowadzeniu do mikroflory osadu czynnego mikroorganizmów wykazujących predyspozycje do rozkładu lipidów i pozwala na uruchomienie reakcji hydrolizy oraz  $\beta$ -oksydacji, w wyniku których substancje tłuszczowe przekształcane są w związki stanowiące łatwo dostępne źródło węgla i energii (3,8-11).

Badany osad czynny, wyhodowany z preparatu przeznaczonego do bioaugmentacji, wykazuje wysoką aktywność lipolityczną głównie dzięki bakteriom z gatunku *Pseudomonas fluorescens* (12,13). Jednak pałeczki z gatunku *Pseudomonas fluorescens* nie wykazują zdolności do tworzenia kłaczek osadu czynnego, jedynie przyłączają się do ich powierzchni. Pałeczki *Pseudomonas fluorescens* mają szerokość od 0,7 do 0,8  $\mu\text{m}$  i długość od 2 do 3  $\mu\text{m}$ . Wytwarzają fluoresceinę powodującą świecenie w promieniach UV. Są tlenowcami, choć niektóre szczepy wykazują zdolność wykorzystywania azotanów i azotynów jako ostatecznych akceptorów elektronów. Optimum temperaturowe dla bakterii tego gatunku mieści się w zakresie 25-30°C (14,15). Stwierdzono, że takie parametry środowiskowe jak temperatura, pH, zawartość azotu oraz węgla, pochodzenie lipidów i stężenie tlenu rozpuszczonego istotnie wpływają na produkcję lipaz przez komórki mikroorganizmów (16).

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę wpływu substratu na zmiany aktywności lipolitycznej i wybrane parametry osadu czynnego. Zbadano działanie różnych kombinacji składu preparowanego dopływu oraz podjęto próbę monitorowania i oszacowania wpływu pH w komorze napowietrzania na aktywność enzymatyczną badanego osadu.



## 2. Materiały i metody

### 2.1. Osad czynny

Osad do badań wyhodowano z preparatu o nazwie handlowej PBA 7002.052 firmy APB *Environnement Fontenay le Vicomte* (France). Zgodnie z opisem przygotowanym przez producenta, oferowany biopreparat zawiera mikroorganizmy wyodrębnione ze środowiska naturalnego i wyselekcjonowane w kierunku ich maksymalnej zdolności do wytwarzania enzymów o aktywności lipolitycznej dla stymulacji degradacji związków tłuszczowych. Skład biopreparatu przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Skład mikrobiologiczny preparatu PBA 7002.052

<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Comamonas</i> sp.	<i>Sporotrichum dimorphosporium</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Trichoderma roseus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Nitrosomonas</i> sp.	<i>Alcaligenes</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Nitrobacter</i> sp.	<i>Acetobacter</i> sp.

### 2.2. Układ badawczy i warunki prowadzenia procesu

Układ badawczy składał się z bioreaktora, do którego dopływały stałe porcje pożywki płynnej. Przez napowietrzanie zapewniano równomierne rozmieszczenie doprowadzanych ścieków w całej objętości reaktora. W takiej samej ilości, w jakiej dopływały świeże ścieki, wypływały ścieki oczyszczone z zawiesiną bakterii.

Badania rozpoczęto poprzez rozpuszczenie 4,375 g preparatu PBA 7002.052 w wodzie destylowanej w reaktorze o objętości 3,5 dm<sup>3</sup>. Przez cały okres badań układ zasilany był ściekami zaolejonymi preparowanymi wg procedury opisanej na rysunku 1. Reaktor pracował w warunkach tlenowych (stężenie tlenu rozpuszczonego, co najmniej 2,5 mg/dm<sup>3</sup>) i stabilizowanej temperaturze 30°C.

### 2.3. Substrat

Podstawowym substratem wykorzystanym w badaniach była oliwa z oliwek. W celu równomiernej dyspersji substratu dodawano Tween 80. Ponadto dostarczano roztwór mikroelementów, którego skład przedstawiono w tabeli 2 (17). Dodat-

kowo do układów B, C oraz D dodawano do pożywki pepton, aby utrzymać podstawową aktywność metaboliczną mikroorganizmów.

Tabela 2

Roztwór mikroelementów zastosowany w ściekach dopływających do reaktora A, B, C oraz D

Substancja	Ilość [g/dm <sup>3</sup> ]	Substancja	Ilość [g/dm <sup>3</sup> ]
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5	CaCl <sub>2</sub>	0,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,6	FeSO <sub>4</sub>	0,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2	NaCl	0,2
MgSO <sub>4</sub>	2,43		

W celu utrzymania w komorze napowietrzania odczynu w zakresie 6,5-7,0, w czasie pracy układów B, C oraz D podjęto próbę skorygowania niskiego pH (5,0-5,5) poprzez dodawanie do ścieków dopływających, odpowiednio, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> lub buforu KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH.

Składy poszczególnych dopływów oraz ChZT dopływu i odpływu układów A, B, C oraz D przedstawiono na rysunku 1.

Obciążenie komory napowietrzania ładunkiem zanieczyszczeń w układach A i B było zmienne i wzrastające w zakresie, odpowiednio, od 0,57 do 9,13 g ChZT/dm<sup>3</sup> d dla układu A i od 0,8 do 16 g ChZT/dm<sup>3</sup> d dla układu B. W układach C i D podjęto natomiast próbę utrzymania obciążenia komory napowietrzania ładunkiem zanieczyszczeń na stałym poziomie w zakresie od 0,7 do 1,2 g ChZT/dm<sup>3</sup> d.

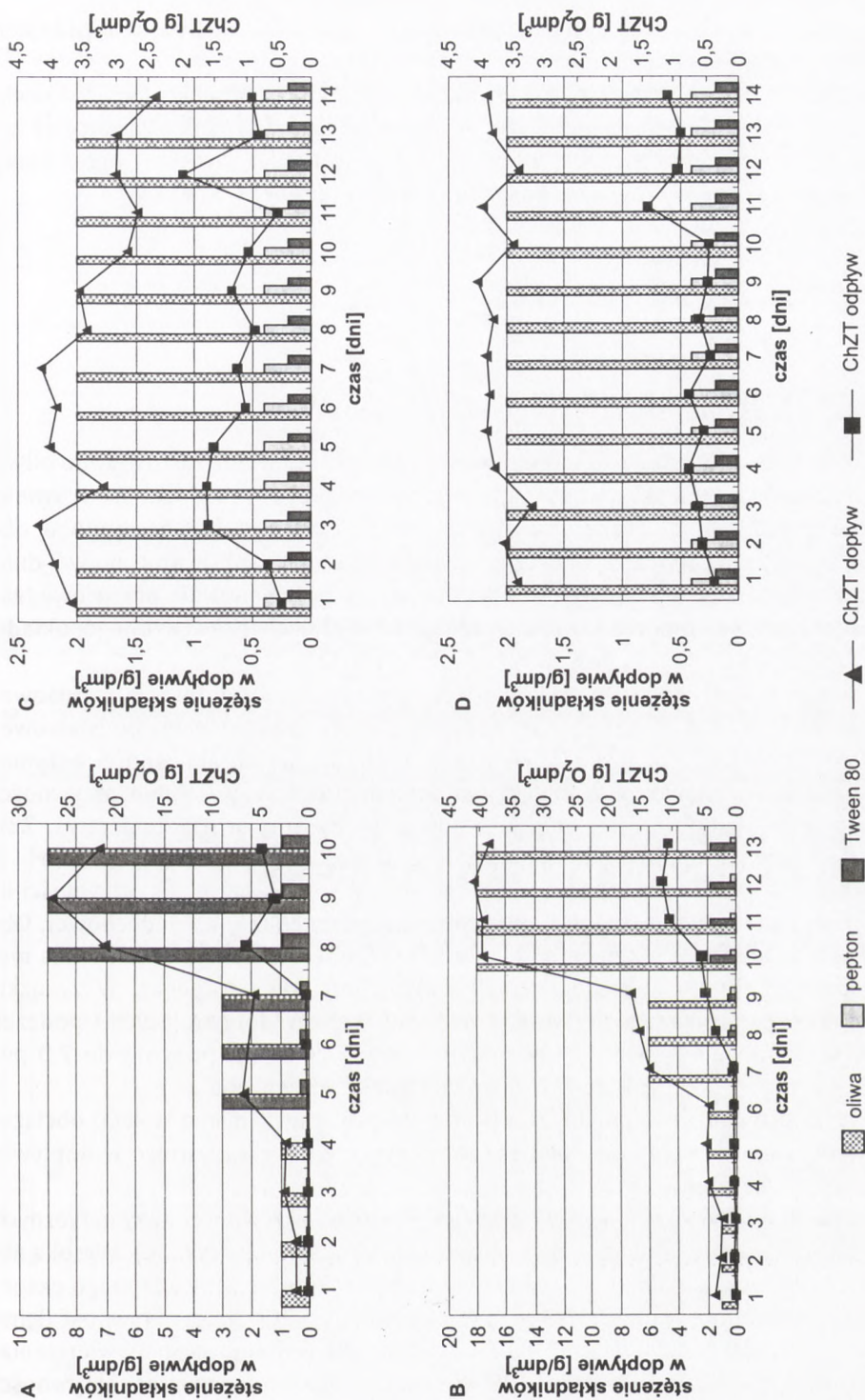
#### 2.4. Oznaczanie aktywności enzymatycznej i wybranych parametrów badanego osadu czynnego

Aktywność lipaz, wytwarzanych przez mikroorganizmy osadu czynnego, oznaczano modyfikowaną metodą Winklera i Stuckmanna (18). Metoda ta polega na spektrofotometrycznym oznaczaniu wolnego *p*-nitrofenolu, który powstaje w wyniku reakcji hydrolizy *p*-nitrofenylolaurynianu katalizowanej przez enzymy lipolityczne. Modyfikacja wykorzystanej metody polegała na wykluczeniu z mieszaniny reakcyjnej gumy arabskiej, która powoduje dyspersję olejów (właściwości badanego osadu pozwalają na prowadzenie pomiarów bez jej dodatku) oraz deoksyholanu sodu doprowadzającego do lizy komórek bakteryjnych, a w następstwie również do możliwości pomiaru aktywności lipaz wewnątrzkomórkowych.

Aktywność dehydrogenaz wyznaczono na podstawie testu TTC, który opiera się na redukcji chlorku 2,3,5-trójfenyloctetrazolowego do barwnego formazanu (TF) w łańcuchu oddechowym, w komórkach mikroorganizmów (19).

Aktywność oddechową wyznaczono za pomocą sondy tlenowej.





Rys. 1. Stężenie składników w dopływie oraz ChZT dopływu i odpływu układów A, B, C oraz D.

Stężenie białka oznaczono metodą Lowry'ego, opartą na barwnej reakcji białek z odczynnikiem Folina–Ciocalteu.

W celu wyeliminowania błędu spowodowanego przez ładunek oliwy z oliwek, zawartość zawiesiny organicznej wyznaczono na podstawie różnicy zawartości zawiesiny organicznej pochodzącej z komory oraz zawartości zawiesiny organicznej w przesączu tej samej objętości badanego osadu pobranej z komory.

### 3. Wyniki badań i ich omówienie

#### 3.1. Porównanie aktywności enzymatycznych

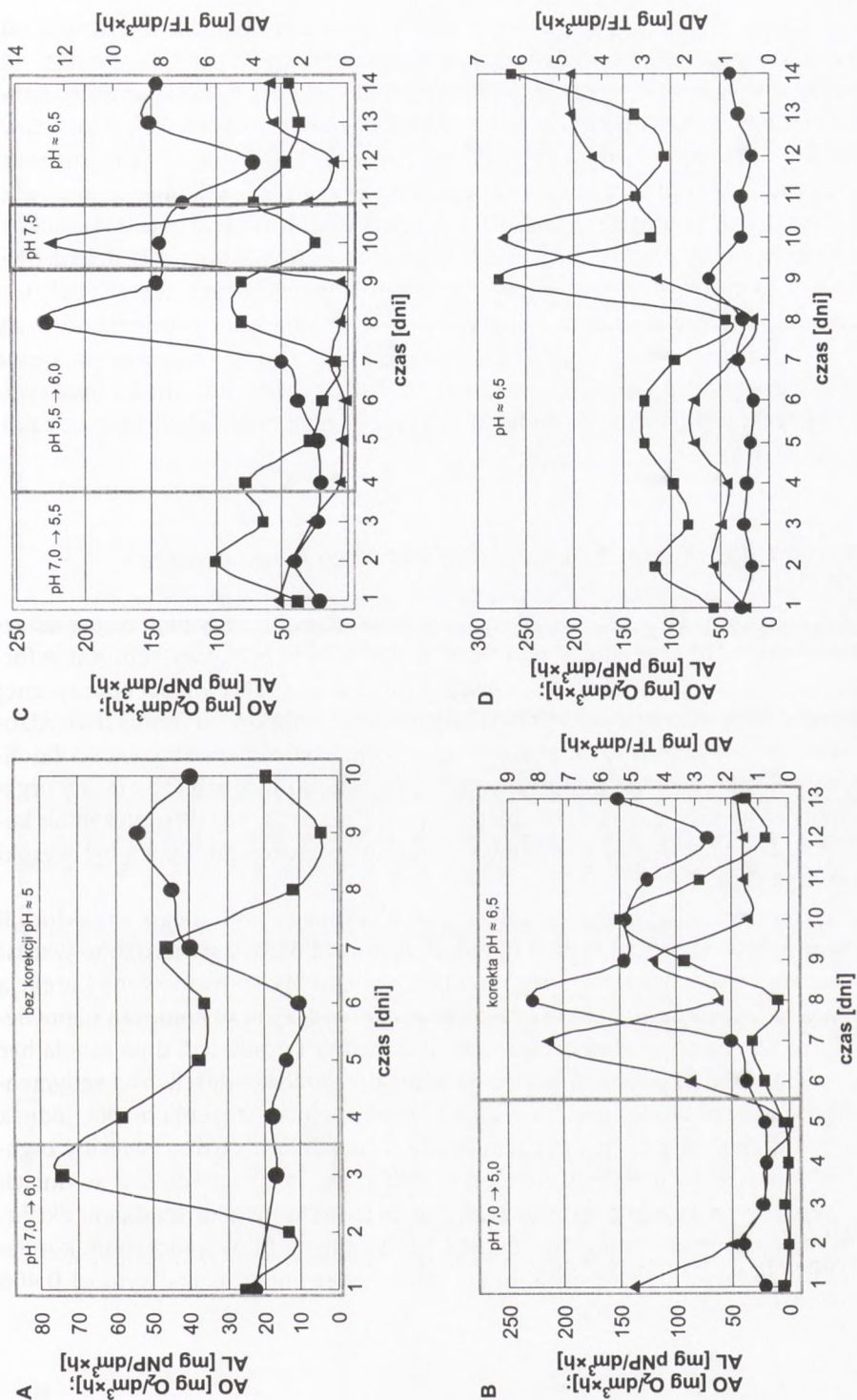
W reaktorze A, w dopływie którego jako jedyne źródło węgla zastosowano oliwę z oliwek, maksymalną aktywność lipolityczną badanego osadu zaobserwowano w 3 dniu prowadzonego eksperymentu (rys. 2A), po czym w 4 dniu nastąpiło jej obniżenie. Najwyższą aktywność oddechową badanego osadu zaobserwowano w 9 dniu prowadzonego układu (rys. 2A). Podczas trwania eksperymentu nie przeprowadzono korekty pH w komorze napowietrzania. Po 4 dniach prowadzonego układu stwierdzono obniżenie odczynu do 5,0 (ramka rys. 2A).

W ściekach dopływających do komory reaktora B jako źródło węgla zastosowano oliwę z oliwek oraz pepton, który dodawano w celu podtrzymania podstawowej aktywności mikroorganizmów. Najwyższe wartości badanych aktywności enzymatycznych stwierdzono, kolejno, dla aktywności dehydrogenaz w 7 dobie, aktywności oddechowej w 8 dobie oraz dla aktywności lipolitycznej w 10 dobie (rys. 2B). Wzrost obciążenia komory ładunkiem zanieczyszczeń do około  $15 \text{ g ChZT} / \text{dm}^3 \cdot \text{d}$  rozpoczęty w 10 dniu pracy reaktora, spowodował spadek zarówno aktywności lipolitycznej osadu czynnego, jak i aktywności dehydrogenaz oraz oddechowej. Obniżenie pH w komorze napowietrzania do 5,0 w 5 dobie eksperymentu (ramka rys. 2B) doprowadziło do znacznego spadku aktywności dehydrogenaz, w związku z czym niezbędna okazała się korekta odczynu ścieków dopływających i podczas prowadzenia układu B zastosowano NaOH. Podwyższenie pH pożywki do 7,0 pozwoliło na utrzymanie w komorze napowietrzania odczynu 6,5.

Podczas prowadzenia układów C i D podjęto próbę utrzymania stałego obciążenia komory napowietrzania ładunkiem zanieczyszczeń, wykorzystując w dopływie jako źródło węgla oliwę oraz pepton.

W układzie C znaczący wpływ na badane wartości aktywności enzymatycznych miało niestabilne pH, wahające się w granicach 5,5-7,5 (ramka rys. 2C). Wysoką aktywność lipolityczną badanego osadu stwierdzono w 2 dobie prowadzonego eksperymentu, a następnie w dniach 8-9 oraz w 11 dobie (rys. 2C). Niską aktywność dehydrogenaz w dniach 4-8 wyjaśnić można niskim pH w komorze napowietrzania. Wzrost pH w komorze do wartości 7,5 spowodował gwałtowny wzrost aktywności





Rys. 2. Zestawienie aktywności enzymatycznych dla poszczególnych układów wraz z zaznaczeniem zmian odczynu w komorze napowietrzania. — AO — aktywność oddechowa, —■— AL — aktywność lipolityczna, —▲— AD — aktywność dehydrogenaz

dehydrogenaz w 10 dniu. Przez pierwsze 7 dni prowadzonych badań aktywność oddechowa utrzymywała się na stałym poziomie. Maksymalną wartość aktywności oddechowej zaobserwowano w 8 dniu. Ustabilizowanie pH do 7,0 spowodowało utrzymywanie się aktywności lipolitycznej na stałym poziomie, natomiast po gwałtownym wzroście odczynu w 11 dniu nastąpił znaczny spadek aktywności dehydrogenaz.

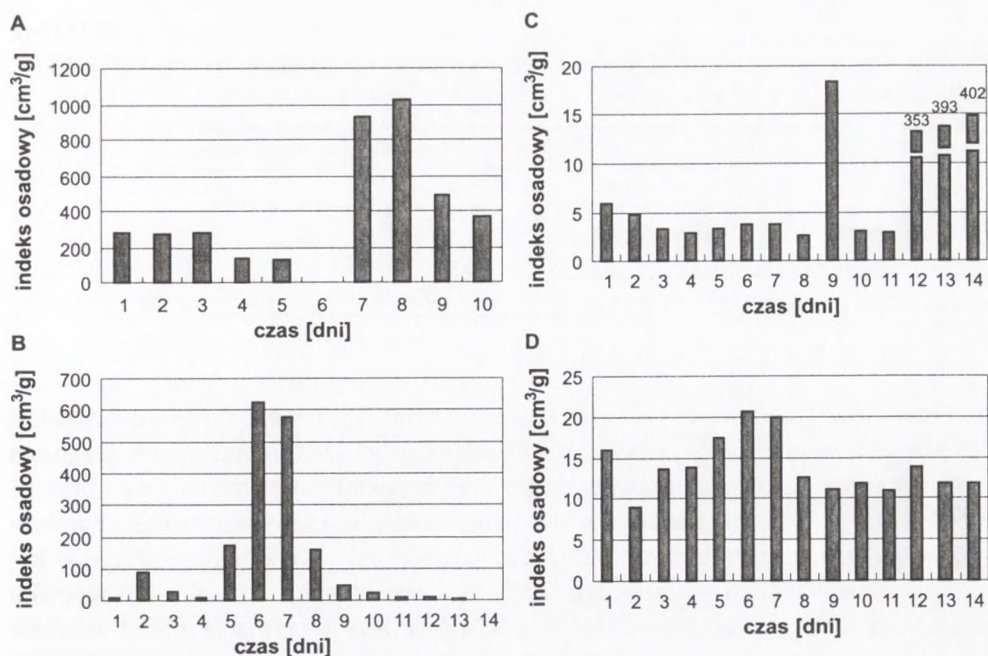
W układzie D w celu utrzymania stałego pH równego 6,5 w komorze napowietrzania zastosowano bufor  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ . Przez 8 dni prowadzonego doświadczenia wzrost aktywności lipolitycznej pociągał za sobą wzrost aktywności dehydrogenaz (rys. 2D). Związki powstałe w wyniku hydrolizy substancji tłuszczowych były wykorzystywane jako źródło węgla i energii, a w ich biologicznym utlenianiu brały udział enzymy z grupy dehydrogenaz. Aktywność oddechowa utrzymywała się na stałym poziomie. W 9 dniu zaobserwowano wzrost zarówno aktywności lipolitycznej, jak i oddechowej badanego osadu. Maksymalną aktywność dehydrogenaz zaobserwowano w 10 dniu.

### 3.2. Porównanie wybranych parametrów badanego osadu czynnego

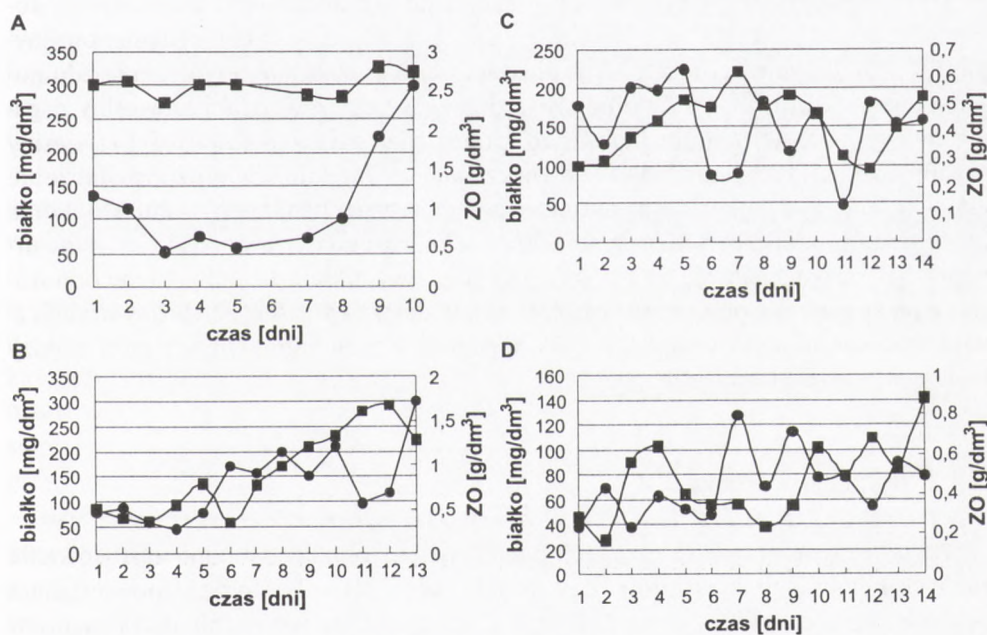
Osad czynny pobrany z reaktora A najwyższe właściwości sedymentacyjne osiągnął w 5 dobie (rys. 3A). W dobie 7 natomiast badany osad czynny występował w formie zdyspergowanej. Jednocześnie zaobserwowano wzrost aktywności lipolitycznej i oddechowej. Stopniową poprawę właściwości sedymentacyjnych osadu stwierdzono w dniach 8-10. Połączona ona była ze znacznym obniżeniem aktywności lipolitycznej, wysoką aktywnością oddechową oraz wzrostem zawartości zawiesiny organicznej oraz zwiększeniem stężenia białka (rys. 2A oraz rys. 4A). Współczynnik korelacji pomiędzy zawartością zawiesiny organicznej a stężeniem białka był wysoki i wyniósł 0,789 (tab. 3).

Najniższe właściwości sedymentacyjne osadu czynnego pobranego z reaktora B zaobserwowano w dniach 6-7 (rys. 3B). Jednocześnie od 6 doby stwierdzono wzrost aktywności enzymatycznych badanego osadu, co mogło być spowodowane korekcją pH pożywki w 5 dniu i stopniowym podwyższaniem odczynu w komorze napowietrzania (rys. 2B). Poprawa właściwości sedymentacyjnych osadu w 8 dniu mogła być spowodowana ustabilizowaniem pH do wartości 6,5. Spadek właściwości sedymentacyjnych osadu w dobie 6 połączony był ze zmniejszeniem stężenia białka, jednak zawartość zawiesiny organicznej w tym czasie wzrosła. Zawartość zawiesiny organicznej w dniach 6-10 utrzymywała się na stałym poziomie, natomiast w dniach 11-12 obserwowano znaczne jej obniżenie, co połączone było ze spadkiem aktywności enzymatycznych badanego osadu (rys. 2B oraz rys. 4B). Współczynnik korelacji pomiędzy zawartością zawiesiny organicznej a stężeniem białka wyniósł 0,406 (tab. 3).





Rys. 3. Zestawienie indeksów osadowych dla reaktorów A, B, C oraz D.



Rys. 4. Zestawienie stężenia białka i zawartości zawiesin dla poszczególnych reaktorów A, B, C oraz D.

■ — stężenie białka, — — stężenie zawiesiny organicznej

Tabela 3

Zestawienie współczynników korelacji pomiędzy białkiem z zawartością zawiesiny organicznej dla układów A, B, C oraz D

Układ	Współczynnik korelacji białko/zawiesina organiczna
A	0,789
B	0,406
C	- 0,059
D	- 0,050

Osad czynny pobrany z reaktora C przez 11 dni wykazywał bardzo dobre właściwości sedymentacyjne (rys. 3C). Spadek właściwości sedymentacyjnych badanego osadu w dobie 12 połączony był z obniżeniem aktywności enzymatycznych oraz ze zmniejszeniem stężenia białka (rys. 4C). Zawartość zawiesiny organicznej charakteryzowała wysoka niestabilność, powodem której mogły być zmienny odczyn w komorze napowietrzania w granicach 5,5-7,5 i zastosowanie w dniach 7-8 węglanu sodu, a w dniach 9-14 buforu  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$  w celu utrzymania pH w zakresie 6,5-7,0. Współczynnik korelacji pomiędzy zawartością zawiesiny organicznej a stężeniem białka wyniósł – 0,059, co oznacza brak liniowej zależności między badanymi parametrami (tab. 3).

Osad czynny pobrany z reaktora D praktycznie przez cały okres prowadzenia doświadczenia charakteryzował się bardzo dobrymi właściwościami sedymentacyjnymi (rys. 3D). Jedynie w dniach 5-7 zaobserwowano nieznaczne pogorszenie zdolności sedymentacyjnych. W 7 dobie stwierdzono wzrost zawartości zawiesiny organicznej (rys. 4D). W 8 dobie zaobserwowano spadek zarówno zawartości zawiesiny organicznej, jak i stężenia białka. Równocześnie w tym dniu stwierdzono obniżenie aktywności dehydrogenaz oraz aktywności lipolitycznej badanego osadu. Od 9 dnia obserwowano stopniowy wzrost stężenia białka, natomiast zawartość zawiesiny organicznej utrzymywała się na stałym poziomie, z wyjątkiem 12 doby, kiedy odnotowano jej spadek. Współczynnik korelacji pomiędzy zawartością zawiesiny organicznej a stężeniem białka wyniósł – 0,05, co oznacza brak liniowej zależności między badanymi parametrami (tab. 3).

### 3.3. Dyskusja wyników

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pomimo zastosowania różnych kombinacji substratów oraz niestabilnego pH w komorze napowietrzania podczas prowadzenia układów A, B oraz C, kolejność następowania maksymalnych aktywności enzymatycznych badanego osadu czynnego tworzy podobny schemat. Zarówno podczas pracy reaktora A, C i D jako pierwszą najwyższą stwierdzono ak-



tywność lipolityczną. Jedynie w układzie B zaobserwowano jako pierwszą maksymalną aktywność dehydrogenaz, jednak towarzyszył jej również wzrost aktywności lipolitycznej badanego osadu. Metabolity powstałe w wyniku hydrolizy substancji tłuszczowych wykorzystywane są przez komórki mikroorganizmów jako źródło węgla i energii, a w ich biologicznym utlenianiu biorą udział enzymy z grupy dehydrogenaz.

W układach B i C obserwowano wysoką aktywność dehydrogenaz w pierwszej dobie doświadczenia. Mogła być ona spowodowana rozpoczęciem pracy bioreaktorów, poprzez podawanie w ściekach dopływających peptonu w celu zapoczątkowania i utrzymania podstawowej aktywności mikroorganizmów. Podczas pracy układu D, zasilanego dopływem również zawierającym pepton, aktywność dehydrogenaz na początku trwania eksperymentu stopniowo wzrastała. Powodem mogło być zastosowanie buforu fosforanowego utrzymującego stałe pH w komorze napowietrzania.

Pomimo że zgodnie z biochemiczną regułą następowania po maksymalnej aktywności lipolitycznej najwyższej aktywności dehydrogenaz, na podstawie przeprowadzonych badań jako kolejną maksymalną, dla układu B, zaobserwowano aktywność oddechową. Podczas prowadzenia reaktora C oraz D maksimum aktywności oddechowej połączone było z najwyższą aktywnością lipolityczną badanego osadu czynnego. Jedynie w trakcie prowadzenia układu A najwyższej aktywności oddechowej towarzyszyła najniższa aktywność lipolityczna osadu.

Przyczyną wystąpienia najwyższej aktywności lipolitycznej połączonej z maksymalną aktywnością oddechową osadu pochodzącego z reaktora C oraz D mogłyby być zmiany cyklu metabolicznego w komórkach mikroorganizmów. Podczas rozpoczęcia pracy reaktora następuje rozproszenie biopreparatu w całej jego objętości. Biopreparat zawiera mikroorganizmy zdolne do tworzenia kłaczków, do powierzchni których przyłączają się bakterie z gatunku *Pseudomonas fluorescens*. Pałeczki te zaczynają produkować lipazy. Enzymy przeprowadzają hydrolizę substancji tłuszczowych i wokół kłaczków gromadzą się substraty pokarmowe, m.in. wolne kwasy tłuszczowe, które stanowią łatwo dostępne źródło węgla i energii. Uwolnione kwasy tłuszczowe zostają wprowadzane do komórek mikroorganizmów i w wyniku  $\beta$ -oksydacji powstaje acetylo-CoA. Nadmiar dostępnej energii doprowadza do współzawodnictwa cyklu kwasu cytrynowego i cyklu glioksalowego o izocytrynian, w wyniku czego w komórkach *Pseudomonas fluorescens* możliwe jest skrócenie cyklu pozyskiwania energii z substratów pokarmowych i efektywniejsze przeznaczenie jej na procesy biosyntezy.

Izocytrynian stanowi główny związek w punkcie rozgałęzienia cykli kwasu cytrynowego i glioksalowego. Enzymem biorącym udział w rozdzielaniu izocytrynianu pomiędzy te dwa cykle jest dehydrogenaza izocytrynianowa, której regulacja opiera się na modyfikacji kowalencyjnej. W wyniku fosforylacji dehydrogenazy izocytrynianowej przez specyficzną kinazę następuje inaktywacja enzymu, a izocytrynian ulega wprowadzeniu w cykl glioksalowy prowadzący do syntezy m.in. glukozy, aminokwa-







Przestawienie cyklu umożliwia szybkie zużywanie substratu pokarmowego i pozyskiwanie energii przeznaczonej na syntezę enzymów lipolitycznych oraz na reprodukcję komórek bakteryjnych. Skrócenie cyklu wymaga wyższej aktywności metabolicznej, w związku z czym wysokiej aktywności lipolitycznej towarzyszy wysoka aktywność oddechowa. Jednak gdy kłaczek osiągnie określony rozmiar, następuje jego rozpad na skutek starzenia komórek oraz gromadzenia szkodliwych produktów przemiany materii. Przyczyną rozpadu kłaczka może być także namnożenie się komórek *Pseudomonas fluorescens*, które doprowadzają do załamania jego struktury. Teoretycznie po rozpadzie kłaczek obserwuje się spadek zdolności sedimentacyjnych osadu czynnego, czego jednak nie zaobserwowano w przeprowadzonych badaniach, w związku z czym hipoteza wymagałaby dalszych eksperymentów w celu jej potwierdzenia.

Najwyższą aktywność dehydrogenaz osadu czynnego w reaktorze C oraz D stwierdzono po maksymalnej aktywności lipolitycznej i oddechowej. Przesunięcie to również mogło wynikać ze skrócenia cyklu pozyskiwania energii z substratów pokarmowych, w czasie którego następuje spadek pH i inhibicja enzymów wewnątrzkomórkowych (19).

Na podstawie wyznaczonych współczynników korelacji nie stwierdzono liniowych zależności pomiędzy badanymi aktywnościami enzymatycznymi osadu czynnego (tab. 4). Najwyższe współczynniki korelacji wyznaczono dla układu B oraz D pomiędzy aktywnością lipolityczną i oddechową, co jest również zgodne z postawioną teorią skrócenia cyklu pozyskiwania energii z substratów pokarmowych przez komórki *Pseudomonas fluorescens*.

Tabela 4

Zestawienie współczynników korelacji pomiędzy poszczególnymi aktywnościami enzymatycznymi dla układów A, B, C oraz D.

Reaktor	Współczynnik korelacji AL/AD	Współczynnik korelacji AL/AO	Współczynnik korelacji AO/AD
A	–	-0,671	–
B	0,041	0,518	-0,029
C	-0,265	0,174	0,265
D	0,485	0,703	0,198

#### 4. Wnioski końcowe

Uzyskane na podstawie przeprowadzonych badań wyniki prowadzą do następujących wniosków:

- Podczas pracy układów zasilanych dopływem o stałym ładunku zanieczyszczeń, kolejność następowania maksymalnych aktywności enzymatycznych badanego osadu czynnego tworzy schemat: jako pierwszą najwyższą obserwowano aktywność



lipolityczną, wraz z towarzyszącą jej maksymalną aktywnością oddechową. Ostatnią najwyższą obserwowano aktywność dehydrogenaz.

– Przyczynami wystąpienia najwyższej aktywności lipolitycznej połączonej z maksymalną aktywnością oddechową osadu pochodzącego z reaktorów zasilanych dopływem o stałym ładunku zanieczyszczeń mogły być zmiany cyklu metabolicznego w komórkach szczepu *Pseudomonas fluorescens*. W wyniku namnożenia tych pałeczek, powiększenia struktury kłaczków, współzawodnictwa cyklu kwasu cytrynowego i glioksalowego o izocytrynian, a także przypuszczalnie zaistnienia warunków beztlenowych wewnątrz kłaczków, w komórkach *Pseudomonas fluorescens* następuje skrócenie cyklu pozyskiwania energii z substratów pokarmowych. Przesunięcie na cykl glioksalowy wymaga wyższej aktywności metabolicznej, w związku z czym wysokiej aktywności lipolitycznej towarzyszy wysoka aktywność oddechowa. Przesunięcie maksymalnej aktywności dehydrogenaz, obserwowane po najwyższej aktywności lipolitycznej i oddechowej, również może wynikać ze skrócenia cyklu, w czasie którego następuje spadek pH i inhibicja enzymów wewnątrzkomórkowych.

– Wysoka aktywność dehydrogenaz w pierwszych dniach prowadzonych układów B i C, mogła być spowodowana rozpoczęciem pracy bioreaktorów poprzez podawanie w ściekach dopływających peptonu w celu zapoczątkowania i utrzymania podstawowej aktywności mikroorganizmów. Stopniowe wzrastanie aktywności dehydrogenaz podczas pracy układu D, pomimo dodawania peptonu do preparowanego dopływu, mogło wynikać z zastosowania buforu fosforanowego utrzymującego stałe pH w komorze napowietrzania.

– Istotnym czynnikiem wpływającym na aktywności enzymatyczne badanego osadu czynnikiem jest odczyn w komorze napowietrzania. W związku z tym podjęto próbę utrzymania stałego pH w zakresie 6,5-7,0 i jako najefektywniejszą metodę uznano buforowanie preparowanego dopływu za pomocą  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ .

Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu nr 1T09D 059 30 „Kontrola i ocena procesu enzymatycznej hydrolizy lipidów w środowisku wodnym”.

## Literatura

1. Dueholm T. E., Andreassen K. H., Nielsen P. H., (2001), *Water Science of Technology*, 43, 165-172.
2. Matsui T., Miura A., Iiyama T., Shinzato N., Matsuda H., Furuhashi K., (2005), *Journal of Hazardous Materials*, B118, 225-258.
3. Chipasa K. B., Mędrzycka K., (2006), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 635-645.
4. Martins A. M. P., Pagilla K., Heijnen J. J., van Loosdrecht M. C. M., (2004), *Water Research*, 38, 793-817.
5. Bednarski W., Adamczak M., Tomasik J., Kowalczyk M., Stasiewicz K., (2005), *Biotechnologiczna modyfikacja składu i właściwości tłuszczów odpadowych*, w: *Enzymatyczna modyfikacja składników żywności*, pr. zb. pod redakcją Kołakowskiego E., Bednarskiego W., Bieleckiego S., Wyd. AR, Szczecin, 355-371.
6. Cammarota M. C., Freire D. M. G., (2006), *Bioresource Technology*, 97, 2195-2210.
7. Jung F., Cammarota M. C., Freire D. M. G., (2002), *Biotechnology Letters*, 24, 1797-1802.



8. Turek-Szytów J., Chojiński D., Miksch K., (2007), *Envir. Protection Engineering*, 33(2), 211-219.
9. Brooksband A. M., Latchford J. W., Mudge S. M., (2007), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 977-985.
10. Crine D. G., Bjornsson L., Alves M., Mattiasson B., (2006), *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 1745-1752.
11. Mongkolthananuk W., Dharmsthiti S., (2002), *International Biodeterioration and Biodegradation*, 50, 101-105.
12. Suzuki T., Mushiga Y., Yamane T., Shimizu S., (1988), *Apply of Microbiology and Biotechnology*, 27, 417-422.
13. Dieckelmann M., Johnson L. A., Beacham I. R., (1998), *J. Appl. Microbiol.*, 85, 527-536.
14. Schlegel G. H., (2003), *Mikrobiologia ogólna*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
15. Leisinger T., Margraff R., (1979), *Microbiological Reviews*, 43, 422-442.
16. Saxena R. K., Ghosh P. K., Gupta R., Davidson W. S., Bradoo S., Gulati R., (1999), *Curr. Sci.*, 77, 101-115.
17. Hsu T-Ch., Hanaki K., Matsumoto J., (1983), *Biotechnology and Bioengineering*, vol. XXV, 1829-1839.
18. Winkler U. K., Stuckmann M., (1979), *Journal of Bacteriology*, 138, 663-670.
19. Miksch K., (1978), *Laboratorium podstaw biochemii technicznej*, Wyd. PŚ, Gliwice.
20. Stryer L., (1999), *Biochemia*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
21. Roca Ch., Olsson L., (2001), *J. Biotech.*, 86, 39-50.