



## Charakterystyka szczepu drożdży *Candida methanosorbosa* BP-6 wykazujących zdolność do degradacji aniliny

Katarzyna Mucha<sup>1</sup>, Ewa Kwapisz<sup>1</sup>, Urszula Kucharska<sup>2</sup>,  
Tadeusz Trzmiel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biochemii Technicznej, <sup>2</sup>Instytut Podstaw Chemii Żywności,  
Politechnika Łódzka, Łódź

### Characterization of *Candida methanosorbosa* BP-6 strain capable of aniline degradation

#### Summary

The ability of some bacteria and filamentous fungi to degrade aniline and its derivatives has been reported in literature. This report is the first one concerning assimilation of aniline by *Candida methanosorbosa* BP-6 strain was isolated from wastewater dye factory by enrichment technique. Activity of this strain to degradation of aniline was compared with four bacterial strains: BD1, BZB1, BR 1, and PKN 7, isolated from the same environment and bacteria *Bacillus subtilis* IBT C-3 derived from the collection of Institute of Technical Biochemistry PL. Among the six tested strains capable to assimilate aniline, the most successful was *Candida methanosorbosa* BP-6 which quickly grows in the presence of high concentration of aniline (1-4%) and can degrade this substrate in the yield of 54-63%.

#### Key words:

biodegradation, aniline, *Candida methanosorbosa*.

#### Adres do korespondencji

Katarzyna Mucha,  
Instytut Biochemii  
Technicznej,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Stefanowskiego 4/10,  
90-924 Łódź.

### 1. Wstęp

Do głównych symptomów współczesnej epoki należy „chemizacja” wszelkiej działalności człowieka. Na długiej liście szczególnie uciążliwych i groźnych substancji czołowe miejsca zajmują

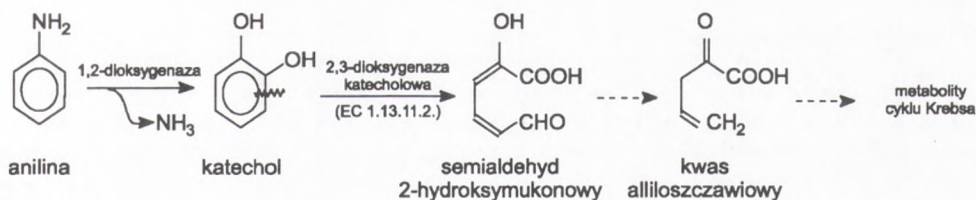
pochodne azotowe związków organicznych, do których należy anilina (1). Ta nienaturalna amina aromatyczna, stanowiąca poważne zagrożenie dla środowiska jest bezbarwną oleistą cieczą o ostrym zapachu i piekącym smaku. Do środowiska przyrodniczego, trafia jako składnik ścieków oraz oparów przemysłowych z zakładów wykorzystujących ją jako surowiec produkcyjny.

Według danych opublikowanych przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (US EPA) (2) toksyczny wpływ aniliny na organizmy żywe może prowadzić – u ludzi do występowania sinicy i represji centralnego układu nerwowego, u drobnoustrojów – do ograniczenia ich wzrostu. W wodzie anilina może ulegać powolnej fotodegradacji. Proces ten katalizowany jest przez substancje humusowe oraz przez niektóre rodzaje glonów. Z powierzchni wody i gleby anilina podlega parowaniu zależnemu od temperatury. Ciśnienie par w 25°C wynosi 0,69 mmHg. Anilina znajdująca się w powietrzu, pod wpływem promieni słonecznych, ulega fotolizie. Produktami jej rozpadu mogą być: N-metyloanilina, N,N-dimetyloanilina, izomery hydroksyaniliny i fenol. Czas połowicznego rozkładu aniliny w atmosferze został określony na około 3,5 godziny (2). Zakłada się jednak, że najbardziej znaczącym mechanizmem powodującym usuwanie aniliny ze środowisk wodnych i gruntowych jest biodegradacja, o czym świadczy stwierdzenie obecności w glebie mikroorganizmów zdolnych do wykorzystania aniliny jako jedyne źródła węgla i azotu.

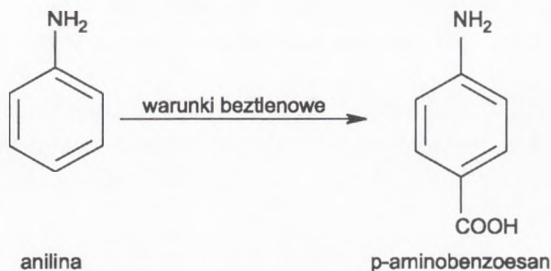
Z dotychczasowych doniesień literaturowych wiadomo, że anilinę mogą degradować następujące drobnoustroje: *Alcaligenes faecalis* (3), *Nocardia* sp. (4), *Rhodococcus erythopolis* AN-13 (5), *Moraxella* sp. (6), *Stenotrophomonas maltophilia* (7), *Frauteria* sp. (8), *Achromobacter* sp. (9), *Flavimonas* sp. (9), *Acinetobacter* sp. (10), *Pseudomonas multivorans* (11), *Pseudomonas acidovorans* (9) oraz *Pseudomonas* sp. (12). Podobne uzdolnienia wykryto u grzybów np. *Alternaria* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. i *Cladosporium* sp. (13).

Z badań przeprowadzonych przez Matsumura i Aoki (14), wiadomo, że zapoczątkowanie rozkładu aniliny u bakterii *Rhodococcus* sp. AN-22, zachodzi z udziałem dioksygenazy anilinowej deaminującej (EC 1.14.12.-) i prowadzi do powstania katecholu. Produktem pośrednim tej reakcji jest 1-amino-2-hydro-*cis*-1,2-dihydroksybenzen. Aktywność tego enzymu jest prawdopodobnie cechą szczególną drobnoustroju. Według Liu i wsp. (15), dioksygenaza anilinowa szczepu *Delftia* sp. AN3 wykazuje aktywność kilkakrotnie wyższą od aktywności oznaczonej przez McClura i wsp. (16) dla szczepów: *Pseudomonas putida* mt-2 i *Pseudomonas acidovorans* CA28. Z badań Takeo i wsp. (17) oraz Fukumori i wsp. (18) wynika, że sekwencje nukleotydowe genów kodujących enzymy odpowiedzialne za utlenianie aniliny do katecholu u bakterii *Acinetobacter* sp. YAA (17) i *Pseudomonas putida* UCC (18), są bardzo podobne.

W następnym etapie przemian, katechol może ulec przekształceniu z udziałem 1,2-dioksygenazy katecholowej do kwasu *cis,cis*-mukonowego (14). Z badań Liu i wsp. (15) oraz Thomas i Peretti (19) wynika, że szczepy *Delftia* sp. AN3 i *Pseudomonas* sp. przekształcają powstały z aniliny katechol z udziałem 2,3-dioksygenazy katecholowej do semialdehydu 2-hydroksymukonowego. Związek ten, konwertowany jest na-



Rys. 1. Biodegradacja aniliny przez szczep *Pseudomonas* CIT1 (19).



Rys. 2. Transformacja aniliny u szczepu XY99 w warunkach beztlenowych (20).

stępnie do metabolitów włączanych do cyklu Krebsa. Pośrednikami tych przemian mogą być kwasy: 2-hydroksymukonowy i alliloszczawiowy (15,19). Drogi biodegradacji aniliny obrazuje rysunek 1 a i b.

Z pracy Kukor i wsp. (20) wynika, że anilina może być degradowana zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. U wyizolowanego w 2001 r. przez Kahng (20) szczepu bakterii oznaczonego symbolem XY99 (pod względem fizjologicznym podobnego do szczepu *Delftia acidovorans*) tlenowa degradacja aniliny przebiega poprzez katechol i kwas 2-hydroksymukonowy. W środowisku beztlenowym natomiast anilina przekształcana jest do p-aminobenzoesanu (20) (rys. 2).

Cytowane badania na temat biodegradacji aniliny, jednej z najważniejszych amin aromatycznych, prowadzone były głównie w warunkach laboratoryjnych, można jednak przypuszczać, że podobne mechanizmy transformacji tego związku mogą zachodzić w środowisku przyrodniczym. Celem badań jest przedstawienie procesu biodegradacji aniliny z udziałem wyizolowanego przez nas szczepu drożdży *Candida methanosorbosa* BP-6. Jest to pierwsze doniesienie o możliwości rozkładu tej trudno degradowalnej i groźnej dla środowiska toksyny z udziałem drożdży. Uzdolnienia szczepu *Candida methanosorbosa* BP-6 w kierunku biodegradacji aniliny opisano odnosząc je do wcześniej badanych pod tym kątem szczepów bakterii. Porównanie to dotyczy zarówno szczepów przez nas wyizolowanych jak i tych opisanych w literaturze.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Szczepy stosowane do badań

Przedmiotem badań były następujące szczepy:

- 1) bakterie *Bacillus subtilis* IBT C-3 pochodzące z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej PŁ,
- 2) BD1 – bakterie wyizolowane z dna zbiornika ścieków,
- 3) BZB1 – bakterie wyizolowane z ziemi pobranej z terenów zakładu produkującego barwniki,
- 4) BR1 – bakterie wyizolowane z brzegu rzeki Bzury płynącej obok zakładu,
- 5) PKN7 – bakterie wyizolowane ze zbiornika końcowego napowietrzania,
- 6) BP6 – (*Candida methanosorbosa*) – drożdże wyizolowane z pompowni osadu wstępnego.

Tabela 1

#### Obserwacje wzrostu badanych drobnoustrojów

Obserwacje makro- i mikroskopowe kultur		
Szczep	Podłoże stałe (YPG)	Podłoże płynne (AY)
BD1 wyzolowane z dna zbiornika ścieków fabryki barwników)	kolonie $\varnothing$ 0,5-1 mm, szarawe, przejrzyste, w preparacie: krótkie pałeczki wielkości 0,5-1 $\mu$ m	wzrost dobry, podłoże koloru kremowego
BZB1 wyzolowane z ziemi pobranej z terenów zakładu produkującego barwniki m.in. anilinę	kolonie $\varnothing$ 1-1,5 mm jasnobezowe, przejrzyste; w preparacie krótkie i maczugowate pałeczki wielkości 1,5 $\mu$ m	wzrost dobry, podłoże koloru kremowego
BR 1 (bakterie wyizolowane z brzegu rzeki Bzury płynącej obok zakładu)	kolonie jasnożółte o $\varnothing$ 1-2 mm, komórki o wielkości 1 $\mu$ m	wzrost dobry, podłoże o odcieniu beżowobrazowym
PKN 7 (bakterie wyizolowane ze zbiornika końcowego napowietrzania)	kolonie błyszczące, szarobezowe o $\varnothing$ od 2 do 4 mm, brzegi kolonii nieregularne, żółtozielone, w preparacie pałeczki o wielkości 2 $\mu$ m	wzrost dobry, podłoże o odcieniu brunatnozielonkawym
BP-6 (szczep drożdży, wyselekcjonowanych z pompowni osadu wstępnego (komora o pojemności 5,5 m)	kolonie białokremowe, wypukłe, o gładkiej powierzchni, w preparacie okrągłe, komórki wielkości 4 $\mu$ m	wzrost obfity, podłoże o odcieniu kremowobrunatnym
<i>B. subtilis</i> IBTC-3 (bakterie pochodzące z kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej)	kolonie jasnobezowe o $\varnothing$ 2 mm, w preparacie komórki o długości 6-8 $\mu$ m układające się w łańcuchy	wzrost dobry podłoże koloru słomkowego

### 3.2. Warunki hodowli badanych szczepów

Izolowanie badanych w ramach pracy drobnoustrojów, prowadzono głównie metodą rozsiewów na płytki z podłożem Kinga A o składzie: 0,1 g/dm<sup>3</sup> glukozy, 0,2 g/dm<sup>3</sup> peptonu, 0,1 g/dm<sup>3</sup> K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,014 g/dm<sup>3</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 g/dm<sup>3</sup> agaru. Do podłoży dodawano anilinę w ilości 20 µl na płytkę w postaci filmu rozprowadzonego na powierzchni podłoża. Wybrane z płytek monokultury, przesiewano na skosy z podłożem YPG (ekstrakt drożdżowy 0,1 g/dm<sup>3</sup>, pepton 0,2 g/dm<sup>3</sup>, glukoza 0,2 g/dm<sup>3</sup>, agar 0,2 g/dm<sup>3</sup>) i stosowano je jako inokulum do hodowli wstrząsanych. Hodowle te prowadzono w podłożu zawierającym: 5 g/dm<sup>3</sup> aniliny, 2 g/dm<sup>3</sup> ekstraktu drożdżowego, 5 g/dm<sup>3</sup> glukozy oraz zestaw soli mineralnych: 1 g/dm<sup>3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g/dm<sup>3</sup>; MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O; 0,5 g/dm<sup>3</sup>; CaCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O; 0,5 g/dm<sup>3</sup> KCl. pH podłoża ustalono w zakresie: 4,0-8,0. Podłoże to oznaczono symbolem AY.

Stosowano następujące parametry hodowli wstrząsanych: prędkość obrotowa – 175 obr/min, amplituda – 4,5 cm, temperatura hodowli – 30°C, czas inkubacji – 9 dni. W celu uniknięcia zjawiska fotolizy, hodowle prowadzono bez dostępu światła.

### 3.3. Określenie stężenia biomasy drobnoustrojów

Stężenie biomasy oznaczano metodą pośrednią dokonując pomiaru zmętnienia płynu hodowlanego. W tym celu zawiesinę rozcieńczano 10-krotnie i mierzono absorbancję prób przy długości fali 660 nm względem wody destylowanej. Wyniki przeliczano na g s.m./dm<sup>3</sup> na podstawie krzywej standardowej wyznaczoną dla odwirowanych i wysuszonych prób biomasy.

### 3.4. Określenie stopnia degradacji aniliny w warunkach hodowli płynnej

Ilość niewykorzystanej podczas hodowli aniliny oznaczano metodą fotometryczną z NEDDC (N-(1-naftylo-)-etyleno-diamino dichlorek) opracowaną przez firmę MERCK i stosowaną do oznaczania barwników azowych. Metoda oznaczania aniliny oparta jest na pomiarze absorbancji roztworu zawierającego barwny produkt reakcji sprzęgania NEDDC z aminą aromatyczną. Anilina w reakcji z NEDDC tworzy kompleks o barwie różowej. Pomiaru intensywności barwy dokonuje się przez pomiar absorbancji ( $\lambda = 550$  nm).

### 3.5. Określenie stopnia degradacji aniliny metodą chromatografii cieczowej (HPLC)

W metodzie chromatograficznej wykorzystano zestaw do HPLC (Gynkotek) wyposażony w: układ pomp P580 A HPG- SOFTRON GmbH (pracujący w systemie izokratycznym), degazer DG- 1310 firmy Dionex, detektor UV-VIS typ UV D 170S, piec STH 585, autosampler typu Gina 505 (Gynkotek) oraz kolumnę i prekolumnę Hyper-sil ODS C<sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5 μm). Zestaw do HPLC sprzężony był z programem komputerowym, pozwalającym na rejestrowanie pików badanych substancji, pojawiających się przy określonych czasach retencji. Oznaczenie przebiegało w temperaturze 25°C. Detekcję przeprowadzono z wykorzystaniem detektora UV-VIS przy długości fali  $\lambda = 236$  nm. Czas jednego pomiaru wynosił 12 minut.

W celu oznaczenia czasu retencji aniliny wykonano krzywą wzorcową, wprowadzając kolejne objętości roztworów aniliny o stężeniach: 0,02-0,001%.

Materiał do badań stanowił płyn hodowlany, po uprzednim odwirowaniu komórek (5000 g x 20 min), przesączeniu przez filtr celulozowy i 20-krotnym rozcieńczeniu wodą redetylowaną. Objętości nastrzykiwanych prób wynosiły 20 μl. Fazę elującą stanowiła mieszanina buforu fosforanowego o pH = 7,5 i metanolu (60:40 v/v).

Zestaw HPLC sterowany był programem komputerowym Chromelon wersji 6.0, zawierającym bibliotekę widm związków i bazę danych umożliwiającą opracowanie wyników pomiarowych.

## 4. Wyniki badań

Badania mikroflory środowisk skażonych aniliną prowadzone pod kątem wyizolowania szczepów wykazujących zdolność do degradacji aniliny to złożone postępowanie skringowe, wymagające przeprowadzenia wielu rozsiewów oraz hodowli wzbogacających w podłożach o zróżnicowanym stężeniu ksenobiotyku, w obecności różnych dodatkowych źródeł węgla i azotu. Izolowanie szczepów prowadzono na podłożach typowych dla bakterii i grzybów, z dodatkiem różnych stężeń aniliny. W hodowlach wzbogacających anilina stosowana była w stężeniach od 0,1 do 3%. Badaniom poddano mikroflorę następujących miejsc byłego zakładu produkującego anilinę: dna zbiornika ścieków, ziemi pobranej z terenów zakładu produkującego barwniki, brzegu rzeki Bzury, której koryto leży obok zakładu barwników, zbiornika końcowego pompowni osadu wstępnego.

Ocenę zdolności wyizolowanych szczepów do biodegradacji aniliny prowadzono na podstawie następujących kryteriów:

- zdolność do wzrostu w obecności aniliny,
- tolerancja na podwyższone stężenia aniliny,
- stopień wykorzystania substratu,

– parametry fizykochemiczne procesu biodegradacji.

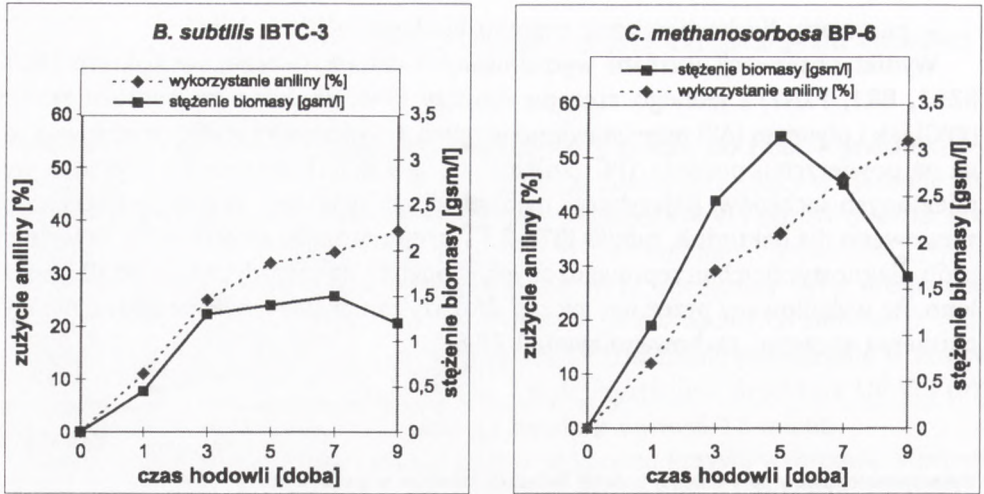
Wyniki obserwacji wzrostu wyizolowanych czterech szczepów bakterii (BD1, BZB1, BR1, PKN7) i jednego szczepu drożdży BP-6, zarówno na podłożu stałym (YPG) jak i płynnym (AY) przedstawiono w tabeli 1. Warstewka aniliny rozprowadzona na powierzchni podłoża YPG „znikała” po 2–4 dniach inkubacji wszystkich wymienionych szczepów. Najszybszy i najbardziej obfity wzrost na obu podłożach obserwowano dla bakterii *B. subtilis* IBTC-3 i szczepu drożdży BP-6 (tab. 1). W wyniku prób diagnostycznych przeprowadzonych w oparciu na metodyce Barnett (25) ustalono, że wyizolowany przez nas szczep drożdży to *Candida methanosorbosa*, dla wyróżnienia szczepu, zachowano symbol BP-6.

Tabela 2

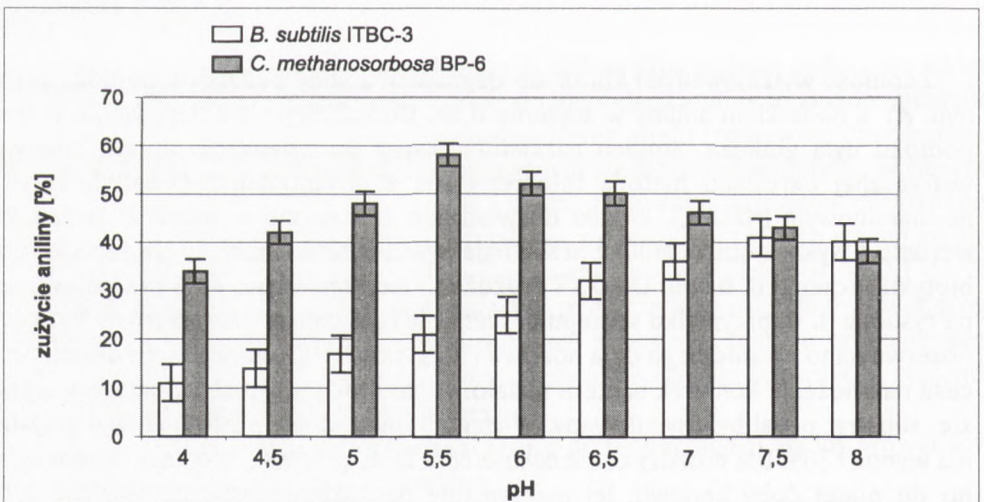
## Wykorzystanie aniliny po 9-dniowej hodowli badanych szczepów w podłożu AY

Szczep	Wykorzystanie aniliny po 9 dniach	
	[mg/cm <sup>3</sup> ]	[%]
BD 1	2,15	28
BZB 2	2,37	32
BR 3	1,3	13
PKN 7	2,43	33
<i>C. methanosorbosa</i> BP-6	3,42	53
<i>B. subtilis</i> IBTC-3	2,62	36

Zdolność wyizolowanych kultur do degradacji aniliny badano w podłożu płynnym AY z dodatkiem aniliny w stężeniu 0,5%. Dodatkowym źródłem węgla w tym podłożu była glukoza. Stopień rozkładu toksyny po dziewięciu dniach hodowli wstrząsanej określano metodą fotometryczną z dichlorkiem N-(1-naftylo)-etyleno-diaminowym (NEDDC). Wyniki doświadczeń zestawiono w tabeli 2. Dynamikę wzrostu i wykorzystania aniliny przez najaktywniejsze w stosunku do tego ksenobiotyku szczepy: *B. subtilis* IBTC-3 i drożdże *C. methanosorbosa* BP-6 przedstawiono na rysunku 3. W przypadku szczepu *B. subtilis* IBTC-3 największe przyrosty biomasy obserwowano do siódmego dnia hodowli (1,5 g.s.m/dm<sup>3</sup>), w następnych dniach procesu namnożenie komórek bakterii malało. Mimo braku przyrostu biomasy w tej fazie, substrat nadal był asymilowany. W ciągu 9 dni hodowli poziom jej wykorzystania wynosił 36%. Dla drożdży *C. methanosorbosa* BP-6, przyrosty biomasy obserwowano do piątej doby hodowli, jej maksymalne namnożenie osiągało wartość 3,24 g.s.m/dm<sup>3</sup>. Zużycie aniliny dla tego szczepu po dziewięciu dniach hodowli wynosiło 50%.

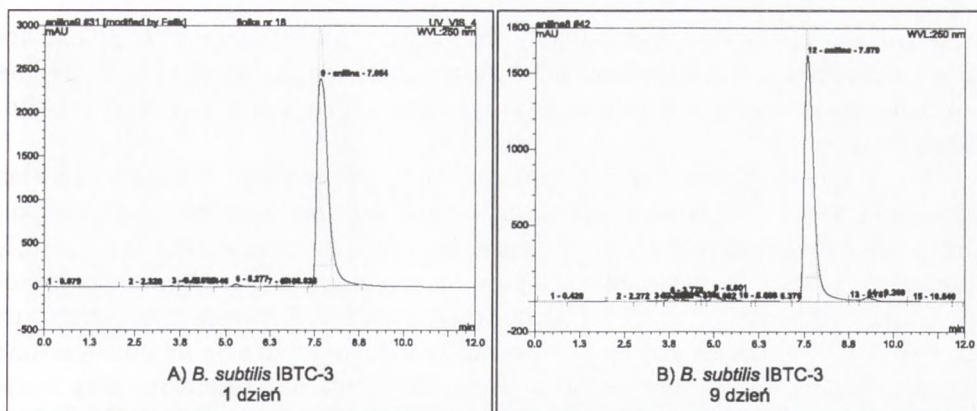


Rys. 3. Dynamika wykorzystania aniliny przez szczepy drożdży *C. methanosorbosa* BP-6 i *B. subtilis* IBTC-3 podczas hodowli w podłożu AY (pH = 6,5).

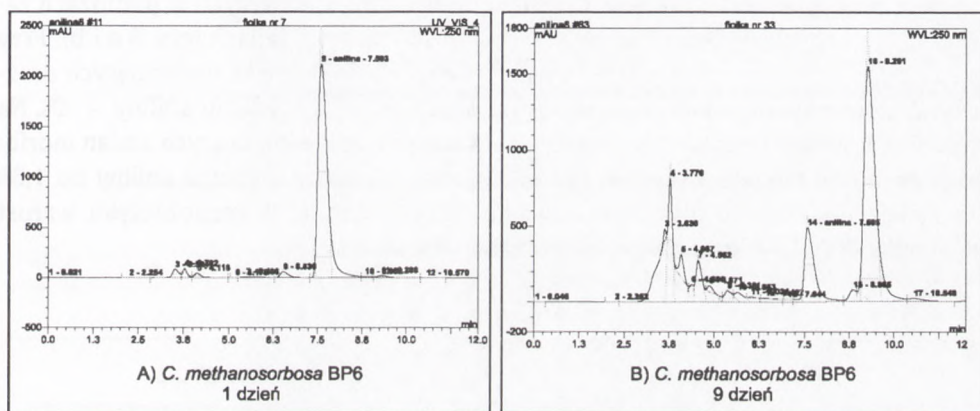


Rys. 4. Wpływ pH podłoża hodowlanego na stopień wykorzystania aniliny u szczepów *C. methanosorbosa* BP-6 i *B. subtilis* IBTC-3.





Rys. 5. Chromatogramy obrazujące stężenie aniliny w hodowli bakterii *B. subtilis* IBTC3, a) po pierwszej dobie hodowli bakterii, b) po dziewięciu dniach trwania hodowli.



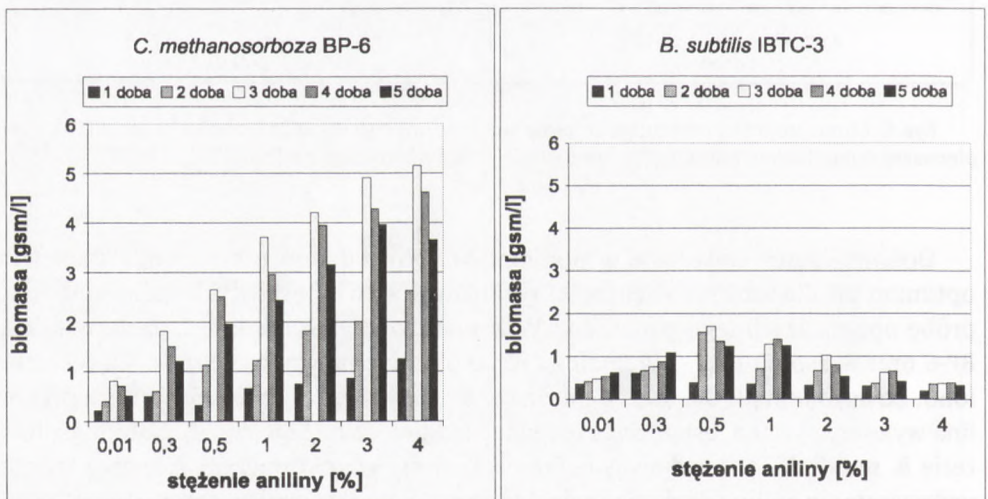
Rys. 6. Chromatogramy obrazujące stężenie aniliny w hodowli drożdży *C. methanosorbosa* BP-6, a) po pierwszej dobie hodowli drożdży, b) po dziewięciu dniach trwania hodowli.

Doświadczenia wykonane w podłożu AY, prowadzono przy pH 6,5. Ponieważ optimum pH dla wzrostu większości gatunków drożdży jest zwykle niższe, podjęto próbę optymalizacji tego parametru. W wyniku hodowli szczepów *C. methanosorbosa* BP-6 oraz *B. subtilis* IBTC-3 w podłożu AY, o pH zmienianym w zakresie 4,0-8,0 ustalono, że optimum pH dla szczepu drożdży BP-6 wynosi 5,5. Przy tej wartości pH anilina wykorzystywana jest w ciągu dziewięciu dni w ilości 58% (rys. 4). Natomiast bakterie *B. subtilis* IBTC-3 wykazują najbardziej obfity wzrost przy pH 7,5, przy którym wykorzystanie aniliny dochodziło do 41% (rys. 4). Wyniki analizy chromatograficznej HPLC płynów pochodzących szczepów BP-6 oraz IBTC-3, z pierwszego i dziewiątego dnia hodowli, przedstawiono na rysunkach 5 i 6 (a i b). Dla obu szczepów

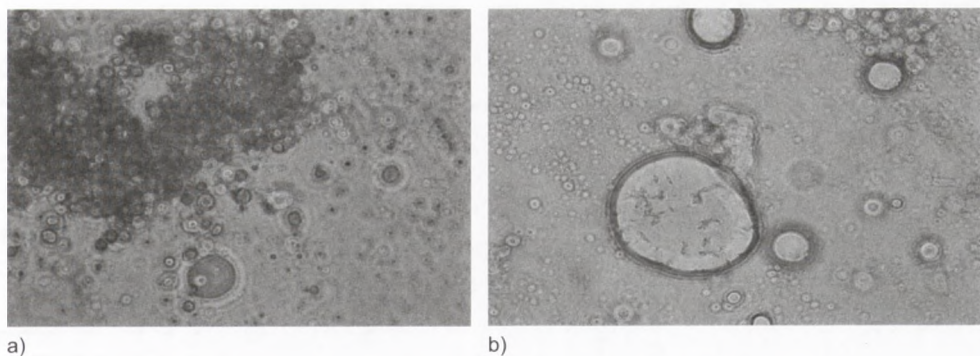
obserwuje się ewidentny ubytek aniliny, przy czym w próbie z dziewiątego dnia hodowli drożdży *C. methanosorbosa* BP-6 obserwować można metabolity pośrednie rozkładu tego związku. Obecności tego typu pośredników nie stwierdzono w hodowli *B. subtilis* IBTC3.

W celu sprawdzenia wpływu stężenia aniliny na wydajność jej biodegradacji oraz określenia tolerancji badanych szczepów na podwyższone stężenia ksenobiotyku, przeprowadzono hodowlę płynną stosując wyjściowe stężenia aniliny: 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; i 4,0%. Doświadczenie to prowadzono w podłożu pozbawionym glukozy, oznaczonym symbolem BY pH podłoża wynosiło 6,5. Z danych zamieszczonych na rysunku 7 wynika, że szczep BP-6 wykazuje wysoką tolerancję na podwyższone stężenia aniliny, nie obserwowano bowiem, obniżenia ilości biomasy przy wzrastających stężeniach substratu w badanym zakresie. Przy zastosowaniu aniliny w ilości 4% plon biomasy w piątym dniu hodowli osiągał wartość: 5,19 g.s.m/dm<sup>3</sup>. W przypadku szczepu *B. subtilis* IBTC-3 najwyższe namnożenie biomasy (1,78 g.s.m/dm<sup>3</sup>) obserwowano przy niskich stężeniach substratu – 0,3-0,5%.

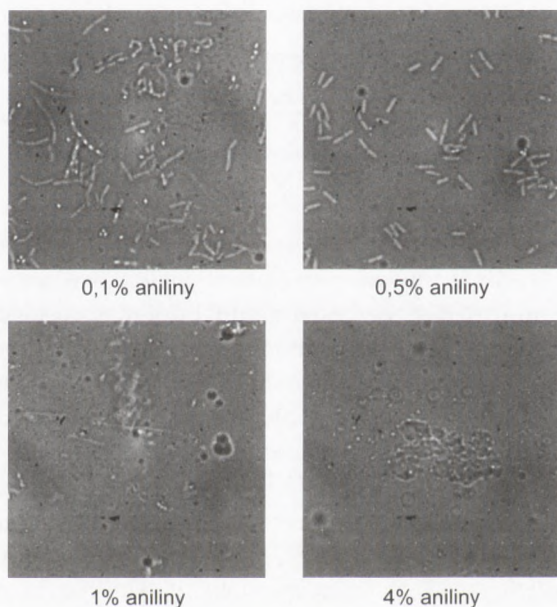
Morfologię komórek drożdży *C. methanosorbosa* BP-6, wyrosłych w podłożach zawierających różne stężenia aniliny przedstawiono na fotografiach (rys. 8 a i b). Przy stężeniu aniliny wynoszącym 0,5-1% widoczne są liczne skupiska pączkujących drożdży. Zmiany obrazu komórek obserwowano dopiero przy stężeniu aniliny – 4%. Na rysunku 9, widać, że anilina w stężeniu 0,1% nie powoduje znaczących zmian morfologii komórek bakterii *B. subtilis* IBTC-3. W miarę wzrostu stężenia aniliny do 1,5% zaczynają dominować formy przetrwalne. Przy stężeniu 3% ksenobiotyku wzrost *B. subtilis* IBT C-3 ulega całkowitemu zahamowaniu.



Rys. 7. Wzrost szczepów *C. methanosorbosa* BP-6 i *B. subtilis* IBTC-3 w podłożu zawierającym anilinę jako jedyne źródło węgla w stężeniach 0,01-4%.



Rys. 8. a) Komórki drożdży *C. methanosorbosa* BP-6 w podłożu AY zawierającym 0,5% aniliny, b) komórki drożdży *C. methanosorbosa* BP-6 w podłożu AY zawierającym 4% aniliny.



Rys. 9. Komórki bakterii *B. subtilis* IBTC-3 w podłożu AY.

W celu określenia, w której fazie wzrostu, anilina oddziałuje szczególnie toksycznie na komórki badanych szczepów wprowadzano ją do podłoża w stężeniu 0,5%: a) równoległe z inokulum, b) po dobie hodowli, gdy komórki były w końcowej fazie wzrostu wykładniczego. Z danych zamieszczonych w tabeli 3 wynika, że dodanie substratu po 24 godzinach hodowli pozwoliło uzyskać dla obu szczepów większy plon biomasy oraz wyższy stopień degradacji aniliny. Różnice w stopniu wykorzystania aniliny wynosiły dla szczepów *C. methanosorbosa* BP-6 i *B. subtilis* odpo-

wiednio: 15 (50→65%) i 9 (41→32%) punktów procentowych. Wynik tego doświadczenia stanowi dość ważną wskazówkę technologiczną i sugeruje by do procesu oczyszczania środowisk skażonych aniliną kierować bardziej dojrzałe kultury drobnoustrojów.

Tabela 3

Wpływ wieku inokulum na wykorzystanie aniliny przez drożdże *C. methanosorbosa* BP-6 i bakterie *B. subtilis* IBTC-3

Wariant podłoża hodowlanego	Zużycie aniliny [%] po 9 dniach hodowli
podłoże AY zaszczerpione <i>C. methanosorbosa</i> BP-6 (anilina dodawana bezpośrednio po zaszczerpieniu)	50
podłoże AY zaszczerpione <i>C. methanosorbosa</i> BP-6 (anilina dodawana po 1 dobie hodowli)	65
podłoże AY zaszczerpione <i>B. subtilis</i> IBTC-3 (anilina dodawana bezpośrednio po zaszczerpieniu)	32
podłoże AY zaszczerpione <i>B. subtilis</i> IBTC-3 (anilina dodawana po 1 dobie hodowli)	41

## 5. Dyskusja wyników

Przedstawiona praca stanowi pierwsze doniesienie opisujące proces biodegradacji aniliny z udziałem drożdży. Wybrane gatunki drożdży sprawdzane były, jak dotąd, jedynie pod kątem ich odporności na tę toksynę. Dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (23) dawka letalna aniliny wynosiła  $4,95 \times 10^{-3}$  g/dm<sup>3</sup>. Wyizolowany przez nas szczep drożdży, zdiagnozowany w oparciu na właściwościach biochemicznych wg metodyki Barnett (24) jako *C. methanosorbosa*, efektywnie degraduje ten ksenobiotyk, nawet w stężeniu wynoszącym 4%. Porównując jego właściwości ze znanymi dotąd z literatury drobnoustrojami degradującymi anilinę *Alcaligenes faecalis* (3), *Nocardia* sp. (4), *Rhodococcus erythropolis* AN-13 (5), *Moraxella* sp. (6), *Stenotrophomonas maltophilia* (7), *Frauteria* sp. (8), *Achromobacter* sp. (9), *Flavimonas* sp. (9), *Acinetobacter* sp. (10), *Pseudomonas multivorans* (11), *Pseudomonas acidovorans* (9) oraz *Pseudomonas* sp. (12), *Alternaria* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. i *Cladosporium* sp. (13) można stwierdzić, że wyizolowany przez nas szczep *C. methanosorbosa* wyróżnia się dużą tolerancją na wysokie stężenia aniliny. Zmiany morfologii komórek obserwowane były dopiero w podłożu zawierającym ksenobiotyk w stężeniu 4%. Opisane w literaturze szczepy bakterii (3-12), degradujące anilinę prowadziły proces jej rozkładu przy stężeniach substratu stosunkowo niskich, maksymalnie 0,5 %. Były to, zatem szczepy o tolerancji na anilinę, zbliżonej do badanego przez nas równoległe szczepu bakterii *B. subtilis* IBTC-3.

Z badań mających na celu dobór warunków biodegradacji aniliny przez szczep *C. methanosorbosa* BP-6 ustalono, że rozkład ksenobiotyku zachodzi najefektywniej

gdy występuje on w stężeniach do 2%. Interesujące jest również to, że wykorzystywanie aniliny zachodzi zarówno w fazie wzrostu szczepu jak i w fazie stacjonarnej. pH podłoża powinno być zbliżone do wartości 5,5. Korzystnie na proces biodegradacji może wpływać obecność kosubstratu, którym w naszym przypadku była glukoza. Zagadnienie to wymaga dalszych badań, bowiem jak wynika z pracy Kahng i wsp. (20) większy dodatek glukozy może powodować ograniczenie szybkości degradacji aniliny. Badacze ci wykazali ponadto, że skutecznym kosubstratem może być mleczan.

Z technologicznego punktu widzenia ważna jest również wskazówka, że starsze komórki (po jednej dobie hodowli) są mniej wrażliwe na obecność aniliny niż komórki namnażające się w obecności ksenobiotyku.

Niepokoić może fakt gromadzenia się pośredników rozkładu aniliny z udziałem badanego w ramach pracy szczepu *C. methanosorbosa* BP-6. Zagadnienie to wymaga oddzielnych badań.

## Literatura

1. Boon N., Goris J., Vos P., Verstraete W., Top E., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1107-1115.
2. U.S. EPA aniline Fact Sheets, (1994), Support document (CAS no. 62-53-3) OPPT Chemical Fact Sheets.
3. Surovtseva E. G., Volnova A. I., (1972), *Microbiol.*, 9, 49-53.
4. Bachofer R., Fritsch E. F., Sambrook T., (1975), *FEBS Lett.*, 50, 288-290.
5. Aoki K., Shinke R., Nishira H., (1983), *Agric. Biol. Chem.*, 47, 1611-1616.
6. Zeyer J., Vasserfallen A., Timmis K. N., (1982), *Pestic. Biochem. Physiol.*, 17, 215-223.
7. Zissi U., Carasimos C., Lyberatos, (1999), *Wat. Environ. Res.*, 71, 43-49.
8. Aoki K., Ohtsuka K., Shinke R., (1984), *Agric. Biol. Chem.*, 48, 865-872.
9. Kahng H., Kim S., Woo M., Park K., Lee Y., (1992), *Kor. J. Microbiol.*, 30, 199-206.
10. Fuji T., Takeo M., (1997), *Microbiology*, 143, 93-99.
11. Helm V., Reber H., (1979), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 191-199.
12. Konopka A., Knight D., Turco R., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 385-389.
13. Emtiazii G., Satarii M., Mazaherion F., (2001), *Wat. Res.*, 35, 1219-1224.
14. Matsumura E., Ooi S., Murakami S., Takenaka S., Aoki K., (2004), *J. Biosc. Bioeng.*, 98, 71-76.
15. Liu Z., Yang H., Huang Z., Zhou Liu S. J., (2002), *App. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 679-682.
16. McClure N. C., Venables W. A., (1986), *J. Gen. Microbiol.*, 132, 2209-2218.
17. Takeo M., Fuji T., Takenaka K., Maeda Y., (1998), *J. Ferment. Bioeng.*, 85, 514-517.
19. Thomas S. M., Peretti S. W., (1998), *Biotechnol. Bioeng.*, 58, 1-12.
18. Fukumori F., Saint C. P., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 399-408.
20. Kahng H.Y., Kukor J. J., Oh K. H., (2000), *FEMS, Microbiol. Lett.*, 190, 215-222.
21. Lyons C. D., Katz S., Bartha R., (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 491-496.
22. Kucharska U., Mucha K., Trzmiel T., *Zastosowanie HPLC do oznaczania aniliny w płynach fermentacyjnych i próbkach środowiskowych*, XXVI Sympozjum Naukowe – Chromatograficzne metody badania związków organicznych, 5-6, Katowice-Szczyrk, 5-6 Czerwca 2002 r., s. 189.
23. Hamblen L. E., Cronin M. T. D., Schultz T. W., (2001), *Chemosph.*, 52, 1173-1181.
24. Barnett J. A R. W., Yarrow D., (1990), *Yeast characteristics and identification*, Cambridge University Press.