



Gromadzenie polihydroksykwasów (PHA) w osadzie czynnym w warunkach limitowanego stężenia azotu.

Cz. II. Ocena zróżnicowania zbiorowisk mikroorganizmów w osadzie czynnym i rodzaj kumulowanych polihydroksykwasów

Ewa Klimiuk¹, Sławomir Ciesielski¹, Tomasz Pokój¹,
Jacek Rogowski²

¹ Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

² Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Politechnika Łódzka, Łódź

Accumulation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in activated sludge under nitrogen limitation conditions. Part II. Estimation of bacterial diversity in activated sludge and analysis of a type of accumulated polyhydroxyalkanoates

Summary

Community diversity of the activated sludge and the type of accumulated PHAs were investigated in this study. Fed-batch culture was carried out using medium culture containing sodium acetate as a carbon source. A factor triggering PHAs synthesis was a lack of nitrogen. The medium culture containing ammonium was periodically fed into bacterial culture for 6 hours each day of the experiment.

Genetic analysis of the bacterial community was performed using 16S and 23S rRNA Intergeneric Spacer Region. The obtained results showed that the dominant belonged to the Betaproteobacteria class.

In this study, the Time of flight – Secondary Ion Mass Spectrometry was used. This method revealed that the cells of the microorganisms contained mainly monomer units of 3-hydroxybutyric acid. The content of P(3HB) in dry weight accounted for 51% between 72nd and 120th hour of the experiment.

Adres do korespondencji

Ewa Klimiuk,
Katedra Biotechnologii
w Ochronie Środowiska,
Wydział Ochrony
Środowiska i Rybactwa,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
ul. Oczapowskiego 5,
10-719 Olsztyn-Kortowo.

biotechnologia

4 (71) 214–226 2005

Key words:

activated sludge, ISR, molecular weight, polyhydroxyalkanoates, poly(3-hydroxybutyrate), TOF-SIMS.

1. Wstęp

Zdolność gromadzenia polihydroksykwasów (PHA) jest u mikroorganizmów dość powszechna. Jednak tylko nieliczne kumulują PHA w stężeniu przekraczającym 50% suchej masy (s.m.). Należą do nich *Ralstonia eutropha* (1,2), *Alcaligenes latus* (3,4), *Azotobacter vinelandii* UWD (5), rekombinowana genetycznie *Escherichia coli* (6-8), *Methylobacterium organophilum* (9), *Pseudomonas putida* (10).

Mikroorganizmy gromadzą polihydroksykwasy krótkołańcuchowe (HA_{SCL}), których monomery zawierają od 3 do 5 atomów węgla oraz średniołańcuchowe (HA_{MCL}) o jednostkach monomerycznych składających się z 6 do 14 atomów węgla (11). O zdolności syntezy polimerów o określonej długości łańcucha decyduje rodzaj aparatu genetycznego, odpowiedzialnego za syntezę i kumulację polihydroksykwasów (12).

Wyróżnia się trzy główne klasy *loci* PHA. *Locus* pierwszej klasy (typ I) charakterystyczny dla *Ralstonia eutropha* składa się z trzech genów kodujących odpowiednio: polimerazę PHA (*phbC*), β -ketotiolazę (*phbA*) i reduktazę acetylokoenzymu A (*phbB*). Do drugiej klasy (typ II) należy *locus* składający się z dwóch różnych genów kodujących polimerazę PHA (*phaC1* i *phaC2*) przedzielonych genem kodującym depolimerazę PHA (*phaZ*). Ten typ charakterystyczny jest głównie dla bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Trzecią klasę (typ III) tworzy *locus* składający się z dwóch genów (*phbE* i *phbC*) kodujących dwie podjednostki polimerazy PHA, ten typ stwierdzono m.in. u *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea* i u *Synechocystis* sp. Mikroorganizmy posiadające *locus PHA* typu I i III gromadzą polihydroksykwasy o krótkim łańcuchu węgla natomiast te należące do typu II kumulują polihydroksykwasy o średniej długości łańcucha węglowego (13).

Z badań przeprowadzonych przez wielu autorów wynika, że mikroorganizmy włączają w łańcuch polimerów przede wszystkim takie substraty, których budowa chemiczna podobna jest do struktury odpowiednich jednostek monomerycznych, wchodzących w skład PHA (14,15). Z tego powodu, w przypadku P(3HB) najbardziej efektywnym substratem jest octan sodu.

Można zatem stwierdzić, że rodzaj i ilość kumulowanych polihydroksykwasów zależy od składu gatunkowego mikroorganizmów i źródła węgla w podłożu. Stąd w przypadku wykorzystania osadu czynnego, ustalenie składu mikroorganizmów jest istotnym czynnikiem umożliwiającym kontrolę i sterowanie procesem.

Metody molekularne są najbardziej dokładną techniką umożliwiającą analizę struktury gatunkowej zbiorowisk mikroorganizmów. Wśród nich najczęściej stosowaną metodą jest rybotypowanie. Polega ona na analizie operonu rybosomowego składającego się z genów kodujących 16S, 23S oraz 5S rRNA wraz z rozdzielającymi

je odcinkami (16). W badaniach środowiskowych szczególnie użyteczny jest polimorficzny fragment rozdzielający geny 16S rRNA i 23S rRNA (ISR – *Intergeneric Spacer Region*). Charakteryzuje się on zróżnicowaniem nie tylko pod względem budowy strukturalnej sekwencji nukleotydowej, ale również pod względem długości. Ponieważ długość odcinka ISR jest charakterystyczna dla poszczególnych gatunków bakterii, jego analiza pozwala na identyfikację mikroorganizmów za pomocą konwencjonalnych metod genetyki molekularnej (17).

Celem pracy była ocena zróżnicowania zbiorowisk mikroorganizmów w osadzie czynnym rosnących na podłożu zawierającym octan oraz określenie rodzaju gromadzonych w biomacie polihydroksykwasów, a także zmian ich stężenia w czasie.

2. Metodyka badań

2.1. Skład chemiczny pożywki

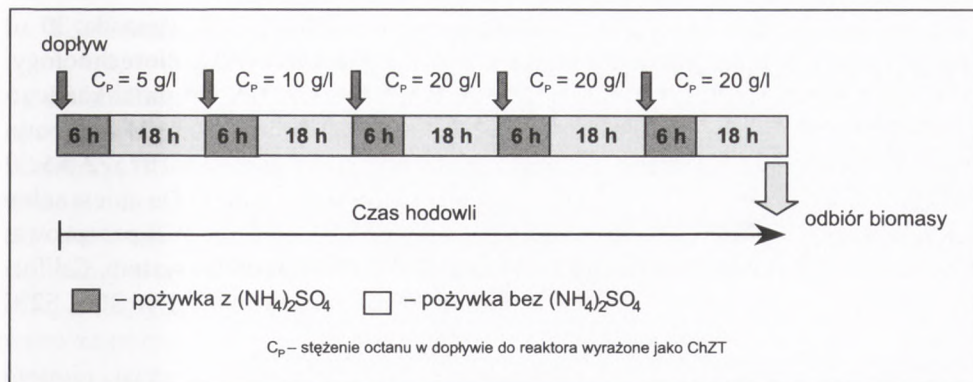
W badaniach jako źródła węgla wykorzystano octan sodu, którego stężenie zwiększano w czasie hodowli od 5 do 20 g O₂/l (ChZT) przy stałej proporcji C/N równej 10. Azot wprowadzano do pożywki w formie roztworu (NH₄)₂SO₄. Pożywkę mineralną przygotowywano w następujący sposób: 2,3 g KH₂PO₄; 0,25 g MgSO₄·7 H₂O; 0,3 g NaHCO₃; 0,1 g CaCl₂·2 H₂O rozpuszczano w litrze wody destylowanej oraz wprowadzano 1 ml roztworu mikroelementów (0,58 g ZnSO₄·7 H₂O; 3,96 g MnCl₂·4 H₂O; 0,6 g H₃BO₃; 5,56 g FeSO₄·7 H₂O; 5,62 g CoSO₄·7 H₂O; 0,34 g CuCl₂·2 H₂O; 0,04 g NiCl₂·6 H₂O; 0,06 g NaMoO₄·2 H₂O rozpuszczonych w litrze 0,5 n roztworu HCl) (18). Czynnikiem stymulującym biosyntezę polihydroksykwasów przez mikroorganizmy był brak azotu. W fazie niedoboru azotu, do reaktora dozowano pożywkę o podanym składzie, bez (NH₄)₂SO₄.

2.2. Warunki hodowli

Badania prowadzono w reaktorze o pojemności czynnej 7 litrów. Reaktor pracował w systemie półciągłym ze stopniowym zasilaniem pożywką.

Inoculum stanowił osad czynny pochodzący z miejskiej oczyszczalni ścieków, który poddano adaptacji do warunków stymulujących biosyntezę kwasu poli-3-hydroksymasłowego, prowadząc przez około 3 miesiące hodowlę w opisanych warunkach.

Hodowlę rozpoczynano od wprowadzenia 2 litrów inoculum o stężeniu suchej masy około 1 g/l. Octan i substancje mineralne dozowano w sposób ciągły. Natężenie przepływu wynosiło litr na dobę. W każdej dobie, czas dozowania pożywki zawierającej azot wynosił 6 godzin, a dozowania pożywki pozbawionej azotu – 18 godzin. Schemat dozowania pożywki z azotem i bez azotu pokazano na rysunku 1.



Rys. 1. Schemat dozowania pożywki do reaktora.

Po uzyskaniu całkowitej objętości wynoszącej 7 litrów hodowlę przerywano, osad o objętości 6 litrów odprowadzano z reaktora. Pozostały osad czynny o objętości litra poddawano regeneracji. Polegała ona na dozowaniu do reaktora pożywki zawierającej azot i mikroelementy, co miało na celu zużycie przez mikroorganizmy zmagazynowanych uprzednio polimerów komórkowych i regenerację osadu. Po regeneracji osad wykorzystywano jako zaszczepienie w następnym cyklu.

2.3. Analiza genetyczna osadu czynnego

2.3.1. Izolacja DNA

Próbkę osadu czynnego o objętości 10 ml pobierano z reaktorów w 72 godzinie hodowli, w której stopień kumulacji PHA w biomase był największy. Przed izolacją DNA pobraną próbkę przemywano trzykrotnie 0,5% roztworem NaCl. Roztwór zlewano, a biomasę pozostawiano do podsuszenia w temperaturze pokojowej. Następnie, 10 mg podsuszonej biomasy umieszczano w 1,5 ml probówkach Eppendorfa i poddawano lizie. Do lizy komórek bakteryjnych zastosowano bufor zawierający proteinazę K i lizozym. DNA ekstrahowano 2-krotnie fenolem, a następnie mieszaniną chloroformu i alkoholu izoamylowego (24:1). Wyekstrahowany DNA strącano izopropanolem, przemywano 70% alkoholem etylowym i zawieszano w sterylnej wodzie (19).

2.3.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy

Odcinek ISR powielano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), a zastosowane startery reakcji PCR przyłączyły się w obrębie ge-

nów kodujących geny 16S i 23S rRNA. Objętość mieszaniny PCR wynosiła 50 μ l i składała się z trzech jednostek polimerazy DNA *SharkMax* (A&A Biotechnology, Gdańsk); 5 μ l buforu PCR (500 mmol KCl, pH 8,5; Triton X-100); 20 pmol każdego z dwóch starterów (IBB PAN, Warszawa); 2,5 mmol $MgCl_2$ oraz 500 μ M nukleotydów. W pracy wykorzystano 3 pary starterów: 1 i 2; *S-D-Bact-1522- β -S-20* i *L-D-Bact-132-a-A-18*; *G1* i *L1*, których sekwencje podano w tabeli. Do mieszaniny PCR dodawano 2 μ l roztworu zawierającego matrycę DNA. Reakcję PCR przeprowadzono w amplifikatorze GeneAmp PCR System 9600 (PE-Applied Biosystem, California, USA), przy następującym profilu temperaturowo-czasowym: 94°C – 30 s, 52°C – 30 s, 72°C – 45 s. Reakcja składała się z 35 cykli.

Tabela

Charakterystyka zastosowanych w pracy starterów reakcji PCR

Nazwa startera	Seqwencja nukleotydomowa	Rozpoznawane miejsce	Przybliżona długość amplikonu	Literatura
<i>1</i>	5'-TTGTACACACCGCCCGTCA-3'	16S rRNA	358 + ISR	(20)
<i>2</i>	5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3'	23s rRNA		(20)
<i>S-D-Bact-1522-β-S-20</i>	5'-TGCGGGCTGGATCCCCTCCTT-3'	16S rRNA	151 + ISR	(21)
<i>L-D-Bact-132-a-A-18</i>	5'-CCGGGTTTCCCCATTCCGG-3'	23s rRNA		(21)
<i>G1</i>	5'-GAAGTCGTAACAAGG-3'	16S rRNA	85 + ISR	(22)
<i>L1</i>	5'-CAAGGCATCCACCGT-3'	23S rRNA		(22)

Powielone fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym, wizualizowano roztworem bromku etydyny i fotografowano. Wielkość produktów PCR oceniano poprzez porównanie z wzorcem masowym DNA 1 Kb (Promega, Wisconsin, USA).

2.3.3. Sekwencjonowanie

Produkt PCR o długości 880 pz powielony za pomocą pary starterów 1 i 2 wyizolowano z żelu za pomocą zestawu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Niemcy). Reakcja sekwencjonowania produktów PCR była przeprowadzana w automatycznym sekwenatorze Perkin Elmer ABI 373 (Dye-Deoxy Cycling Sequencing; PE – Applied Biosystem, California, USA) w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. W reakcji tej użyto tych samych starterów, co do amplifikacji DNA.

2.3.4. Analiza sekwencji DNA

Do analizy filogenetycznej przeznaczono odcinek DNA o długości 629 par zasad obejmujący ISR wraz z fragmentem genu kodującego 23S rRNA (128 pz). Uzyskaną sekwencję DNA porównano z innymi sekwencjami nukleotydowymi zgromadzonymi w Banku Genów za pomocą programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (23). Do analizy filogenetycznej włączono sekwencje DNA najbardziej zbliżone do uzyskanej w tej pracy oraz homologiczne sekwencje DNA należące do bakterii z bardziej odległych filogenetycznie grup. Wszystkie sekwencje nukleotydowe analizowano za pomocą programu Clustal W (24). Analizę filogenetyczną przeprowadzono metodą „łączenia sąsiadujących taksonów” (*Neighbor – Joining Method*) (25) korzystając z programu MEGA 2.1 (26).

Uzyskana sekwencja DNA odcinka ISR wraz z fragmentem genu 23S rRNA została zdeponowana w Banku Genów pod numerem akcesyjnym AY 509613.

2.4. Charakterystyka chemiczna polihydroksykwasów kumulowanych w osadzie czynnym

Do analizy polihydroksykwasów wykorzystano spektrometrię mas jonów wtórnych TOF-SIMS. Metoda ta polega na analizie jonów emitowanych z powierzchni badanej próbki pod wpływem bombardowania jej jonami o energii rzędu 10-25 keV (27,28).

2.4.1. Przygotowanie próbek

Do próbek zawierających próbki badanych polimerów wprowadzono po 0,1 ml metanolu i tak sporządzone roztwory w ilości 0,05 ml nanoszono na płytki srebrne, uprzednio wytrawione w 20% roztworze HCl przez 5 min. Po odparowaniu metanolu (w temperaturze pokojowej), próbki umieszczano w spektrometrze. Zebrano również widmo mas jonów wtórnych kwasu poli-3-hydroksymasłowego zakupionego w firmie Aldrich, który przyjęto jako wzorzec.

2.4.2. Pomiary metodą spektrometrii mas jonów wtórnych

Widma mas zebrano przy użyciu spektrometru mas jonów wtórnych z analizatorem czasu przelotu TOF-SIMS IV firmy ION-TOF (ION-TOF GmbH, Muenster, Niemcy). W czasie pomiaru badane polimery, znajdujące się na podłożu srebrnym, były napromieniowane impulsową wiązką jonów $^{69}\text{Ga}^+$ o energii 25 keV. Czas trwania jednego impulsu około 700 ns, częstotliwość 3,3 kHz, prąd wiązki pierwotnej 2,5 pA,

wielkość napromieniowanego obszaru $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$, czas zbierania widma 300 s. Widma dodatknych jonów wtórnych zostały zarejestrowane z wykorzystaniem analizatora czasu przelotu (TOF) o dużej rozdzielczości masowej ($m/\Delta m$) rzędu 5000 dla masy 29 Da.

2.5. Analiza ilościowa poli-3-hydroksymaślanu w osadzie czynnym

W próbkach biomasy wykonywano następujące analizy chemiczne:

- zawiesiny ogólne zgodnie z Polską Normą PN-72/C-04559.02 (29);
- P(3HB) zgodnie z metodyką podaną przez Law, Slepecky (30). W tym celu próbkę osadu czynnego pobraną z reaktora inkubowano w Cloroxie (The Clorox Company, Oakland, Ca. USA) w temperaturze 37°C przez godzinę. Po inkubacji biomasę przemywano kolejno wodą destylowaną, acetonem oraz alkoholem etylowym 96%. Z tak przygotowanej próbki ekstrahowano polimer trzema porcjami wrzącego chloroformu. Następnie, chloroform odparowywano, a pozostałość rozpuszczano w stężonym kwasie siarkowym. Zawartość biopolimeru w próbce oznaczano przy użyciu spektrofotometru (Optima SP-3000 UV/VIS) przy długości fali 235 nm.

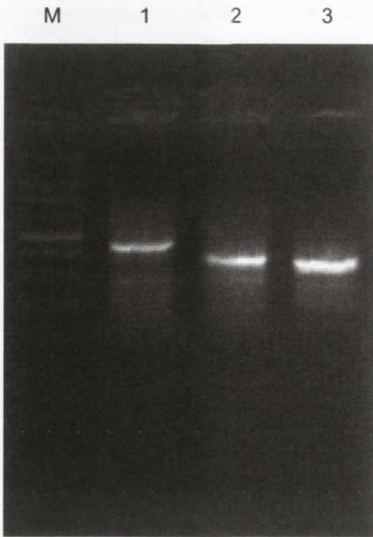
3. Omówienie wyników badań

3.1. Analiza zróżnicowania zbiorowisk mikroorganizmów w osadzie czynnym

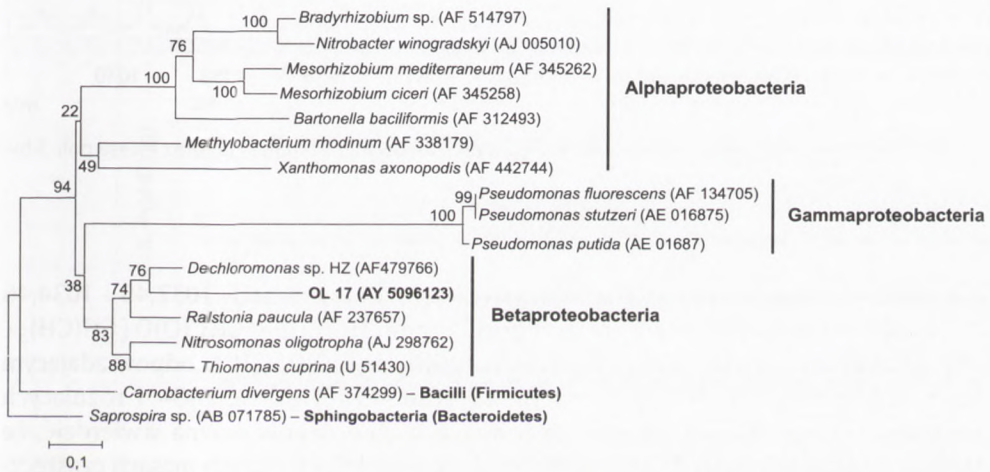
Do amplifikacji ISR zastosowano trzy różne pary starterów reakcji PCR, co umożliwiło otrzymanie produktów PCR o trzech różnych wielkościach (około 880, 680 i 600 pz) (rys. 2).

Do sekwencjonowania wybrano najdłuższy odcinek o długości około 880 pz, który powielono za pomocą starterów opisanych przez Jensena i wsp. (22). Uzyskano sekwencję nukleotydową o długości 629 pz, z czego 501 pz przypadało na odcinek ISR. Na podstawie analizy porównawczej z homologicznymi sekwencjami zgromadzonymi w Banku Genów, przeprowadzonej za pomocą programu BLAST stwierdzono, że uzyskana sekwencja jest najbardziej podobna do homologicznego odcinka DNA klasy Betaproteobakteria, a dokładniej najbliższa była sekwencji *Dechloromonas* sp. HZ (numer akcesyjny AF 479766).

W celu dokładniejszego wskazania pozycji taksonomicznej badanej bakterii przeprowadzono analizę filogenetyczną, do której włączono 16 homologicznych sekwencji DNA zgromadzonych w Banku Genów. Wynikiem tej analizy jest drzewo filogenetyczne przedstawione na rysunku 3. Grupuje ono sekwencje DNA badanego mikroorganizmu wśród bakterii należących do klasy Betaproteobakteria.



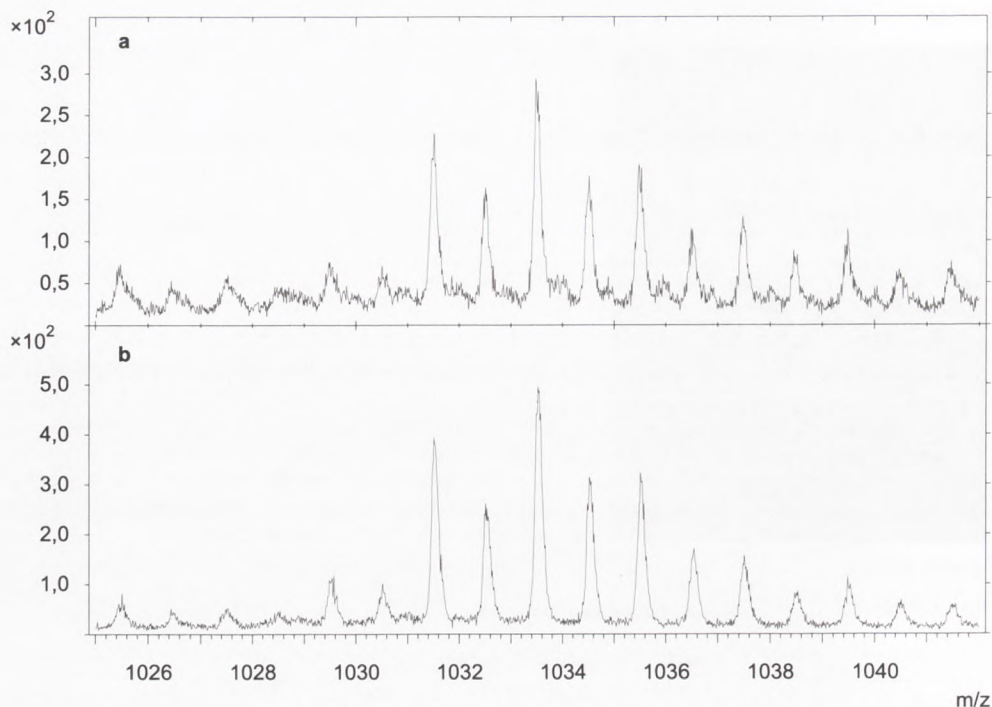
Rys. 2. Rozdział produktów PCR odpowiadających odcinkowi ISR wraz z fragmentami genów kodujących 16S i 23S rDNA, powielonego w oparciu na trzech różnych parach starterów. Ścieżki: 1 – 880 pz, 2 – 680 pz, 3 – 600 pz, M – marker molekularny 1 Kb (Promega, Wisconsin, USA), szczegóły w tabeli 1. Elektroforezę prowadzono w żelu agarozowym (1,5%).



Rys. 3. Pozycja filogenetyczna gatunku OL 17, analizowanego w pracy. Drzewo skonstruowano wykorzystując najbliższe genetycznie sekwencje odcinka ISR zgromadzone w Banku Genów (w nawiasach podano numery akcesyjne). Drzewo skonstruowano wykorzystując metodę „łączenia sąsiadujących taksonów” (25).

3.2. Charakterystyka chemiczna polihydroksykwasy w osadzie czynnym

Na podstawie wyników badań składu polihydroksykwasy wykazano, że wśród PHA dominował kwas poli-3-hydroksymasłowy. Na rysunku 4 przedstawiono porównanie widm mas jonów wtórnych substancji wyekstrahowanej z osadu czynnego oraz kwasu poli-3-hydroksymasłowego (próbka kontrolna). W obu widmach, w przedstawio-

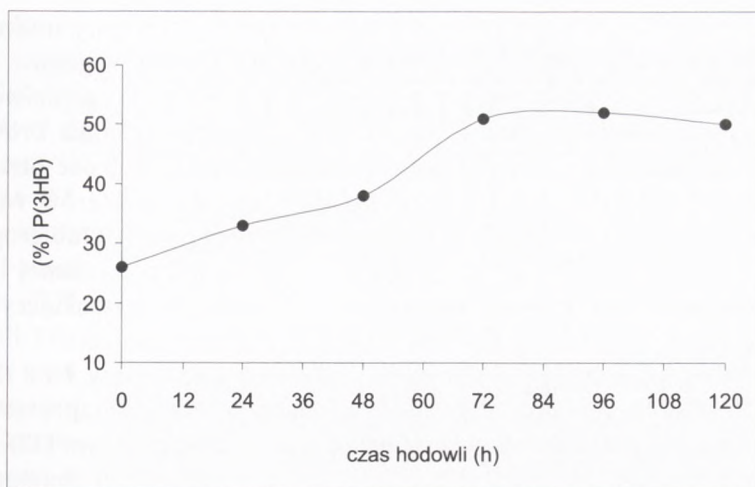


Rys. 4. Widmo mas jonów wtórnych substancji wyekstrahowanej z biomasy (a) oraz kwasu poli-3-hydroksymasłowego (b).

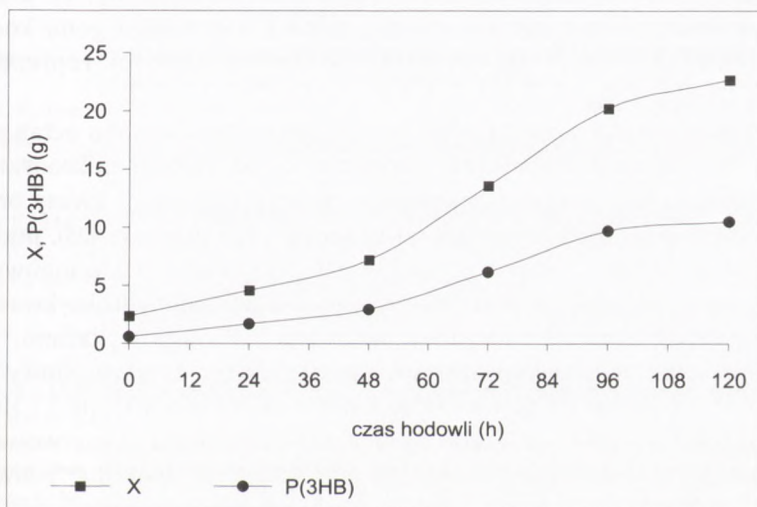
nym zakresie mas, występują charakterystyczne piki przy masach 1032,45 i 1034,46 Da, które można jednoznacznie przypisać jonom $\text{HC}(\text{CH}_3)=\text{CHC}(\text{O})\text{O}\{\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\}_{11}\text{H}^+$ i $\text{HCH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\{\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{H}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\}_{11}\text{H}^+$ odpowiadającym makrocząsteczkom P(3HB) zawierającym 11 grup $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}-$ i różniących się grupami terminalnymi. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że badana substancja zawierała kwas poli-3-hydroksymasłowy o małych masach cząsteczkowych.

3.3. Zmiany stężenia kwasu poli-3-hydroksymasłowego w czasie hodowli

Wyniki badań przedstawiające procentowy udział P(3HB) w biomacie w zależności od czasu pokazano na rysunku 5. Z prezentowanych danych wynika, że największy stopień kumulacji wynoszący 51% s.m. uzyskano pomiędzy 72 a 120 godziną hodowli. W tym czasie stężenie octanu w pożywce wynosiło 20 g O_2/l (ChZT). W reaktorze stężenie zawiesin ogólnych wzrosło około 8-krotnie z 1,84 do 14,32 g, a kwasu poli-3-hydroksymasłowego około 17-krotnie z 0,61 do 10,54 g (rys. 6).



Rys. 5. Procentowy udział P(3HB) w suchej masie osadu w zależności od czasu.



Rys. 6. Zmiany stężenia suchej masy osadu oraz P(3HB) w zależności od czasu.

4. Dyskusja

Analiza molekularna odcinka ISR znajduje szerokie zastosowanie w wielu badaniach, mających na celu charakterystykę zróżnicowania gatunkowego mikroorganizmów środowisk wodnych i lądowych (31,32). Obserwowana zmienność tego odcinka sprawia, że jego analiza może być wykorzystana do typowania gatunków, a nawet szczepów bakterii (22).

W pracy tej do amplifikacji odcinka ISR wykorzystano trzy pary uniwersalnych starterów, których sekwencje są komplementarne do fragmentów genów 16S i 23S rRNA, otaczających odcinek ISR. Zastosowanie trzech różnych par uniwersalnych starterów gwarantowało możliwość amplifikacji wybranego odcinka DNA bakterii należących do wszystkich znanych grup filogenetycznych. Wielkość otrzymanych produktów PCR świadczy o tym, że wszystkie trzy pary starterów rozpoznały i przyłączyły się w czasie reakcji PCR do genomu jednego gatunku lub grupy gatunków bardzo blisko spokrewnionych (mających odcinek ISR o tej samej długości). Brak zróżnicowania gatunkowego w tego rodzaju próbie jest zaskakujący i wynika najprawdopodobniej z długiego okresu adaptacji osadu czynnego.

W uzyskanej sekwencji DNA powielonej za pomocą starterów 1 i 2 (22) ujawniono, że w osadzie dominował gatunek należący do klasy Betaproteobacteria. Jest to najszerszej reprezentowana klasa bakterii w osadzie czynnym (33). Zastosowane metody molekularne pozwoliły poznać jeden z najbardziej zmiennych fragmentów genomu dominanta, jednakże nie pozwoliły na dokładne wskazanie gatunku. Wynika to z faktu, że sekwencje nukleotydowe badanego odcinka DNA są poznane jedynie dla ograniczonej liczby gatunków. Wydaje się, że dla przyporządkowania badanej bakterii do rodzaju, celowa jest analiza genu kodującego 16S rRNA, którego sekwencje są nieporównywalnie szerzej reprezentowane w Bankach Genów (34).

W badaniach tych jako źródło węgla organicznego zastosowano octan sodu. Homopolimer P(3HB) gromadzony jest zazwyczaj w komórkach mikroorganizmów, wówczas gdy źródłem węgla zastosowanym do jego syntezy są kwasy organiczne o parzystej liczbie atomów węgla jak kwas octowy, czy masłowy (35), podczas gdy obecność innych lotnych kwasów tłuszczowych (propionowy, walerionowy) prowadzi do syntezy P(3HV) (36). W przeprowadzonej analizie polihydroksykwasów z wykorzystaniem spektrometrii mas jonów wtórnych TOF-SIMS wykazano, że dominującym rodzajem polihydroksykwasów był kwas poli-3-hydroksymasłowy. Wskazuje na to obecność jonów $\text{HC}(\text{CH}_3)=\text{CHC}(\text{O})\text{O}\{\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\}_{11}\text{H}^+$ i $\text{HCH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\{\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{O}\}_{11}\text{H}^+$. Jony takie były również obserwowane z wykorzystaniem innych metod spektrometrii mas takich jak MALDI (37) oraz ESI-MS (38).

W badaniach własnych ilość P(3HB) zmieniała się od 26 do 51% i od 72 godziny hodowli pozostawała na prawie stałym poziomie. Najwyższy stopień kumulacji P(3HB) (88% s.m.) osiągnęli Wang, Lee (4) w hodowli okresowej *Alcaligenes latus* prowadzonej na pożywce z dodatkiem sacharozy, w warunkach limitowanych stężeniem azotu. Niewiele niższą zawartość P(3HB) wynoszącą 82% s.m. odnotowali Ryu i wsp. (2) w komórkach *Ralstonia eutropha*, wykorzystując jako substrat glukozę oraz limitując wzrost mikroorganizmów stężeniem fosforu w podłożu. W osadzie czynnym w warunkach beztlenowo-tlenowych najwyższy stopień kumulacji P(3HB) uzyskano na ściekach miejskich zawierających octan, jego wartość wyniosła około 30% (39).

5. Wnioski

1. Efektywność produkcji polihydroksykwasów z wykorzystaniem osadu czynnego zależy w dużym stopniu od poznania struktury zbiorowisk. W zastosowanej w pracy metodzie polegającej na analizie sekwencji DNA fragmentu operonu rybosomalnego *ISR* wykazano, że w prowadzonej hodowli dominował jeden gatunek bakterii należący do klasy Betaproteobacteria.

2. W badaniach przeprowadzonych za pomocą metody spektrometrii mas jonów wtórnych (TOF-SIMS) ustalono, że substancja wyekstrahowana z biomasy zawiera kwas poli-3-hydroksymasłowy. Stwierdzenie takie opiera się na występowaniu w widmie mas jonów wtórnych badanej substancji charakterystycznych pików jonów kwasu poli-3-hydroksymasłowego o małych masach cząsteczek rzędu 1000 Da występujących również w analogicznym widmie kwasu poli-3-hydroksymasłowego pochodzenia biologicznego.

3. Największy stopień kumulacji wynoszący 51% uzyskano pomiędzy 72 a 120 godziną hodowli, gdy stężenie octanu w pożywce wynosiło 20 g O₂/l (ChZT).

Literatura

1. Kim B. S., Lee S. C., Lee S. Y., Chang H. N., Chang Y. K., Woo S. I., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 892-898.
2. Ryu H. W., Hahn S. K., Chang Y. K., Chang H. N., (1997), *Biotechnol. Bioeng.*, 55, 28-32.
3. Yamane T., Fukunaga M., Lee Y. W., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 197-202.
4. Wang F., Lee S. Y., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3703-3706.
5. Page W. J., Cornish A., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 4236-4244.
6. Wang F., Lee S. Y., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4765-4769.
7. Ahn W. S., Park S. J., Lee S. Y., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3624-3627.
8. Ahn W. S., Park S. J., Lee S. Y., (2001), *Biotechnol. Lett.*, 23, 235-240.
9. Kim S. W., Kim P., Lee H. S., Kim J. H., (1996), *Biotechnol. Lett.*, 18, 25-30.
10. Lee S. Y., Choi J., Wong H. H., (1999), *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, 31-36.
11. Anderson A. J., Dawes E. A., (1990), *Microbiol. Rev.*, 54, 450-472.
12. Madison L. L., Huisman G. W., (1999), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 21-53.
13. Steinbüchel A., Fächtenbusch B., (1998), *Trends Biotechnol.*, 16, 419-427.
14. Huisman G. W., de Leeuw O., Eggink G., Witholt B., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1949-1954.
15. Chen G. Q., Xu J., Wu Q., Zhang Z., Ho K. P., (2001), *Reactive & Functional Polymers*, 48, 107-112.
16. Kur J., Lewandowski K., Krawczyk B., Samet A., (2000), *Post. Mikrobiol.*, 39, 271-290.
17. Garcia-Martinez J., Acinas S.G., Antón Antén I., Rodriguez-Valera F., (1999), *J. Microbiol. Methods*, 36, 55-64.
18. Choi M. H., Yoon S. C., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3245-3254.
19. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
20. Dolzani L., Tonin E., Lagatolla C., Prandin L., Monti-Bragadin C., (1995), *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1108-1113.
21. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X., Neyra M., Simonet P., (1996), *ITS analysis of prokaryotes*, Eds. Akkermans D. L., van Elsas J. D., de Bruijn E. I., 1-12, in: *Molecular Microbial Ecology Manual*, Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
22. Jensen M. A., Webster J. A., Straus N., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 945-952.

23. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J., (1990), *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
24. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., (1994), *Nucl. Acids Res.*, 22, 4673-4680.
25. Saitou N., Nei M., (1987), *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
26. Kumar S., Tamura K., Jakobsen I. B., Nei M., (2001), *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
27. Benninghoven A., (1994), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 1023-1043.
28. Briggs D., (1992), *Static SIMS – surface analysis of organic materials*, Eds. Briggs D., Seah P. M., in: *Practical surface analysis* (2nd ed.), John Wiley & Sons, Chichester.
29. Polska Norma 72/C-04559.02 – Oznaczenie zawiesin ogólnych, mineralnych i lotnych metodą wagową.
30. Law J. H., Slepecky R. A., (1961), *J. Bacteriol.*, 82, 33-36.
31. Borneman J., Triplett E. W., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2647-2653.
32. Suzuki M. T., Rappé M. S., Haimberger Z. W., Winfield H., Adair N., Ströbel J., Giovannoni S., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 983-989.
33. Wagner M., Amann R., Lemmer H., Schleifer K. H., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1520-1525.
34. Gonzalez J. M., Ortiz-Martinez A., Gonzalez-delValle M. A., Laiz L., Saiz-Jimenez C., (2003), *J. Microbiol. Methods*, 55, 459-463.
35. Wang J., Yu J., (2001), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 121-126.
36. Ruan W., Chen J., Lun S., (2003). *Process Biochem.*, 39, 295-299.
37. Yu G. E., Marchessault R. H., (2000), *Polymer*, 41, 1087-1098.
38. Jedliński Z., Adamus G., Kowalczyk M., Schubert R., Szewczyk Z., Stefanowicz P., (1998), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12, 357-360.
39. Chua A. S. M., Takabatake H., Satoh H., Mino T., (2003), *Wat. Res.*, 37, 3602-361.