

# **Przegląd prac z zakresu mikrobiologii**



# **Przegląd prac z zakresu mikrobiologii**

Redakcja:  
Monika Maciąg  
Kamil Maciąg

Lublin 2018

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdecznie podziękowania  
dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje  
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

**Recenzentami niniejszej monografii byli:**

- dr hab. inż. Jacek Czerwiński, prof. PL
- dr n. farm. Anna Biernasiuk
- dr n. med. Małgorzata Kozioł
- dr Monika Jach
- dr Agnieszka Kuźniar
- dr Maciej Masłyk
- dr Anna Pytlak
- dr Anna Siedliska
- dr Bożena Sikora
- dr inż. Amelia Staszowska

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:  
Monika Maciąg

Projekt okładki:  
Marcin Szklarczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-65932-44-0

Wydawca:  
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.  
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin  
[www.wydawnictwo-tygiel.pl](http://www.wydawnictwo-tygiel.pl)

## Spis treści

Alicja Szymkiewicz, Joanna Wilk, Ewa Adamek, Wojciech Baran <i>Badanie biodegradacji tylozyny w próbkach środowiskowych</i> .....	7
Marta Wiśniewska <i>Biologiczne przetwarzanie odpadów komunalnych w warunkach tlenowych i beztlenowych</i> .....	25
Sylwia M. Duda, Wojciech Cel <i>Oczyszczanie ścieków przemysłowych w reaktorach typu SBR</i> .....	34
Arkadiusz Gruca, Piotr Dulian, Janusz Jaglarz, Magdalena Greczek-Stachura <i>Wpływ fotoaktywnych, związanych z powierzchnią, nanocząstek ZnO na wybrane szczepy bakterii</i> .....	43
Andrzej Jurkowski, Monika Kierpiec, Jacek J. Koziół <i>Wpływ dyspersji nanocząstek Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na wybrane parametry hodowli L. plantarum 299v</i> .....	52
Adriana Szutt (Pacia), Małgorzata Nabrdalik, Agnieszka Dołhańczuk-Śródka <i>Działanie pelargoniowego olejku eterycznego na Bacillus spp.</i> .....	61
Mateusz Jackowski, Magdalena Lech, Anna Trusek-Hołownia <i>Przegląd metod produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu</i> .....	69
Katarzyna Bonio, Barbara Chudzik, Andrzej Niewiadomy, Mariusz Gagoś <i>Aktywność przeciwrzybcza 2-(4-fluorofenyloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazolu (FABT)</i> .....	77
Zuzanna Orwat, Małgorzata Nabrdalik, Agnieszka Dołhańczuk-Śródka <i>Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktu roślinnego z Dionaea muscipula</i> .....	91
Monika Karasiewicz-Urbańska <i>Potencjalne wykorzystanie bakteriofagów w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych wywołujących mastitis</i> .....	100
Sławomira Maria Dumala <i>Skuteczność procesu sterylizacji w układzie przepływowym, dla zmiennej konfiguracji lamp UVC, przy wykorzystaniu bakterii Micrococcus luteus</i> .....	110
Indeks Autorów .....	119



## **Badanie biodegradacji tylozyny w próbkach środowiskowych**

### **1. Wstęp**

Szacuje się, że od czasu wprowadzenia pierwszych antybiotyków do terapii do chwili obecnej czyli w przeciągu ostatnich osiemdziesięciu lat, ilość wyprodukowanych antybiotyków wyniosła ponad 1 milion ton. Obecnie, roczna produkcja tych leków jest na poziomie 100-200 tysięcy ton [1].

Dane z krajów Unii Europejskiej oraz z krajów niezrzeszonych z lat 2010-2014 wskazują na znaczącą tendencję wzrostową w całkowitej konsumpcji antybiotyków stosowanych w lecznictwie otwartym oraz w lecznictwie zamkniętym a wyrażoną w dawkach dobowych definiowanych (DDD) na 1000 mieszkańców na dzień. Szczególnie niepokojący jest wzrost przeciętnego zużycia karbapenemów, tzw. leków ostatniej szansy, stosowanych w leczeniu zakażeń wieloopornymi bakteriami. W kilku krajach (w Danii, na Węgrzech oraz we Włoszech) wzrosło zużycie polimyksyn, w tym kolistyny stosowanej do leczenia zakażeń bakteriami opornymi na karbapenemy [2]. Negatywnym efektem terapii antybiotykowych, czyli eliminacji mikroorganizmów wrażliwych na ich działanie, jest pozostawienie tzw. bakterii antybiotkoopornych. Są one zdolne do przekazywania genów warunkujących tę oporność nie tylko na drodze pionowej, ale także horyzontalnego transferu genów, pomiędzy komórkami tego samego lub różnych gatunków. Intensywne prace nad projektowaniem nowych, skutecznych leków przeciwdrobnoustrojowych są tylko tymczasowym rozwiązaniem problemu. Po pewnym czasie, wskutek stosowania w terapii nowych leków, mikroorganizmy patogenne zaadaptują się i – w efekcie – nowe antybiotyki również będą nieskuteczne. Już w 1997 roku, Światowa Organizacja Zdrowia uznała antybiotkooporność za jedno z ważniejszych zagrożeń w dziedzinie zdrowia publicznego [3].

Dane statystyczne sprzed 2006 roku wykazały, że nawet 90% sprzedawanych antybiotyków weterynaryjnych stosowano w hodowli zwierząt jako stymulatory wzrostu a tylko 10% w leczeniu zwierząt.

Powszechne zastosowanie antybiotyków w weterynarii miało miejsce po zakończeniu II Wojny Światowej. Okazało się, że oprócz działania przeciwdrobnoustrojowego

---

<sup>1</sup> a.szymkiewicz94gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

<sup>2</sup> j.kliww@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

<sup>3</sup> eadamek@sum.edu.pl, Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

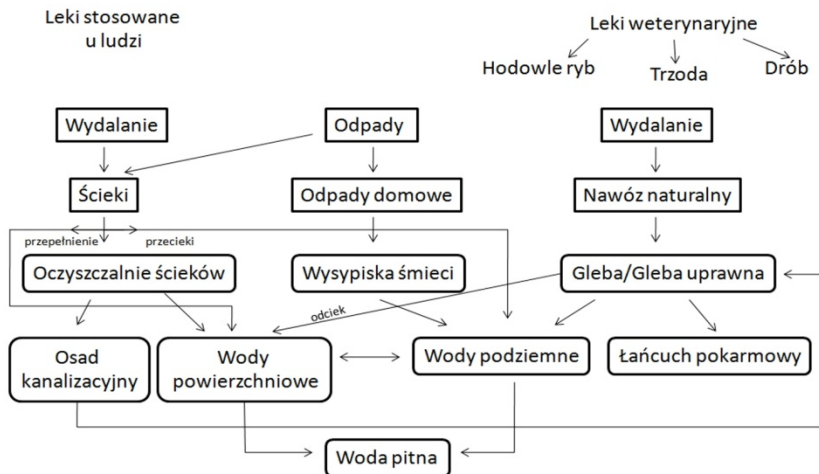
<sup>4</sup> bw-xxl@wp.pl Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

ustrojowego wpływają one na współczynnik wzrostu. Zaczęto stosować niewielkie dawki antybiotyków wraz z paszą aby zwiększyć dzienny przyrost masy ciała oraz lepiej wykorzystać dostępną ilość paszy. Jako pierwszy antybiotykowy stymulator wzrostu zastosowano penicylinę a od 1961 roku – tylozynę. Z powodu rosnącej lekooporności drobnoustrojów chorobotwórczych znacznie ograniczono zastosowanie antybiotyków jako stymulatorów wzrostu. Początkowo zostały one wycofane w krajach skandynawskich, a następnie w Europie. Istnieją jednak kraje, w których stosowanie antybiotykowych stymulatorów wzrostu jest nadal dozwolone, np. w Australii, Stanach Zjednoczonych oraz w Chinach [4]. Pomimo obowiązującego zakazu, chęć zysku u niektórych hodowców wpłynęła na powstanie i rozwój „czarnego rynku”. Potwierdzają to liczne doniesienia prasowe, informujące o możliwości nielegalnego kupna tych leków.

Pod koniec lat 90-tych XX wieku pojawiły się pierwsze badania dotyczące obecności farmaceutyków i produkty higieny osobistej w środowisku [5]. Obecnie, substancje lecznicze można znaleźć w każdym elemencie geosfery, jednak największy ich odsetek występuje w glebie pól uprawnych oraz wodach powierzchniowych. Do tych ostatnich, pozostałości leków trafiają z:

- odpadów poprodukcyjnych;
- ścieków komunalnych zawierającymi wydaliny ludzkie i zwierzęce;
- wysypisk odpadów;
- obornika, trafiającego na pola w postaci nawozu;
- niewłaściwy sposób przechowywania oraz utylizacji preparatów farmaceutycznych znajdujących się w gospodarstwach domowych;
- ścieków pochodzenia szpitalnego [6, 7].

Schemat przedstawiający obieg farmaceutyków w środowisku umieszczono na rysunku 1.



Rys. 1. Zarys źródeł i dystrybucji farmaceutyków w środowisku [6].



Do środowiska przedostają się w postaci niezmienionej lub jako metabolity. Do gleby, pozostałości antybiotyków trafiają najczęściej wraz ze ściekami oraz nawozami naturalnymi pochodzącymi z farm hodowlanych [8]. Wysokie stężenie leków w tych odpadach powoduje, że również w glebie te stężenia są znaczne. Może to negatywnie wpłynąć zarówno na strukturę populacji mikroorganizmów glebowych jak też i ich liczbę. Obserwuje się np. wzrost liczby grzybów w porównaniu do liczby bakterii. Niektóre antybiotyki silnie wiążą się z cząstkami gleby co powoduje ich wolniejszą degradację. W wodach płynących stężenie antybiotyków jest mniejsze niż w glebie a jedną z przyczyn jest ich stałe rozcieńczanie. Obecność pozostałości antybiotyków stwierdza się w ponad 50% badanych próbek wody [9]. W wodach powierzchniowych ich stężenia sięgają kilkuset ng/l. Na podobnym poziomie są metabolity leków przeciwdrobnoustrojowych [10, 11]. Wodach podziemnych płynących w pobliżu farm hodowlanych, stężenie makrolitów sięgało 2000 ng/l [12]. Tetracykliny i sulfonamidy występowały w licznych próbkach pobranych z wód powierzchniowych i gleby, a ich stężenie sięgało, odpowiednio, 250 mg/l wody i 170 mg/kg gleby [13]. Jednak stała obecność pozostałości antybiotyków w wodach powierzchniowych jak i w glebie wpływa jednak nie tylko na strukturę populacji mikroorganizmów w danym ekosystemie ale także na selekcję opornych szczepów organizmów patogennych.

Usuwanie ze środowiska naturalnego ksenobiotyków nosi nazwę biodegradacji. Występuje ona powszechnie we wszystkich ekosystemach. Związki organiczne są rozkładane najczęściej przez saprobionty, np. bakterie, grzyby. Biodegradacja ma na celu przekształcenie złożonych związków organicznych w prostsze, łatwiej przyswajalne przez rośliny. Substancje pochodzenia naturalnego są znacznie łatwiej rozkładane niż syntetyzowane sztucznie, których degradacja może zachodzić nawet setki lat [14].

Proces biodegradacji wspomagają czynniki takie jak:

- światło słoneczne;
- obecność mikroorganizmów wspomagających;
- dostępność tlenu i materii nieorganicznej;
- temperatura (proces ten jest spowolniony w niskich temperaturach);
- skład i struktura gleby, jej pH, wilgotność oraz obecność kwasów humusowych.

Istotny problem związany z oczyszczaniem odpadów (ścieków) zawierających antybiotyki wiąże się z ich właściwościami fizyko-chemicznymi. Są to związki o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej i znacznej trwałości. Tymczasem konwencjonalne oczyszczalnie ścieków (mechaniczno-biologiczne) nie są przystosowane do utylizacji tego typu związków, ponieważ nie wszystkie mikroorganizmy wchodzące w skład osadu czynnego mogą wykorzystywać antybiotyki jako źródło energii. Ponadto, niektóre farmaceutyki są jedynie adsorbowane na koloidach, związkach humusowych i cząstkach gruntu (np. glinach) stanowiących jądra kłaczków osadu czynnego i – tym samym – nie podlegają dalszym procesom degradacyjnym.

Do czynników wpływających na adsorpcję farmaceutyków należą:

- lipofilowość (im większa tym substancja lepiej się adsorbuje);
- kwasowość (leki o charakterze kwasowym są słabiej adsorbowane) oraz
- oddziaływania elektrostatyczne z cząsteczkami stałymi (w tym przypadku z mułem dennym) [15, 16].

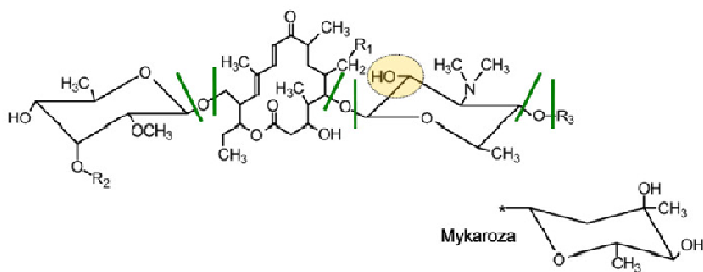
Zużyty osad czynny bywa wykorzystywany do nawożenia pól uprawnych a obecne w nich pozostałości antybiotyków i mikroorganizmy trafiają – wraz z opadami atmosferycznymi – do wód powierzchniowych. Wyniki wielu prac badawczych wskazują, że oczyszczalnie ścieków można traktować jako rezerwuar genów oporności a tym samym jako jedno ze źródeł rozprzestrzeniania się antybiotykoodporności [17]. Obserwowano istotny wzrost liczby opornych mikroorganizmów oraz genów oporności w miejscach poniżej zrzutu ścieków z oczyszczalni [18]. Przyczyną tego jest fakt, że w reaktorach biologicznych istnieją bardzo korzystne warunki do rozmnażania się mikroorganizmów, w tym również bakterii posiadających geny oporności. Szczególnie niepożąca jest obecność mikroorganizmów posiadających oporność wielolekową wobec powszechnie stosowanych antybiotyków [17].

## 2. Budowa i mechanizm działania makrolidów

Związki należące do grupy makrolidów składają się z części aglikonowej oraz sacharydowej połączonych wiązaniem glikozydowym.

Część aglikonową stanowi bezazotowy pierścień laktonowy, składający się z najczęściej parzystej liczby atomów węgla. Makrolidy naturalne posiadają pierścienie 12-24 członowe, choć zdarza się, że ich liczba dochodzi do 60. Działanie terapeutyczne wykazują związki posiadające 14 lub 16 atomów węgla w pierścieniu części aglikonowej. Pierścień może posiadać podstawniki najczęściej metylowe i hydroksylowe co warunkuje powstanie węgli asymetrycznych. Możliwe jest również powstanie wiązań podwójnych między atomami węgla; takie związki należą do grupy makrolidów polienowych.

W skład części sacharydowej wchodzi metylopentozy połączone wiązaniem o-glikozydowym z częścią laktonową. Jedna z nich posiada ugrupowanie dimetyloaminowe, wpływające na działanie farmakologiczne [19].



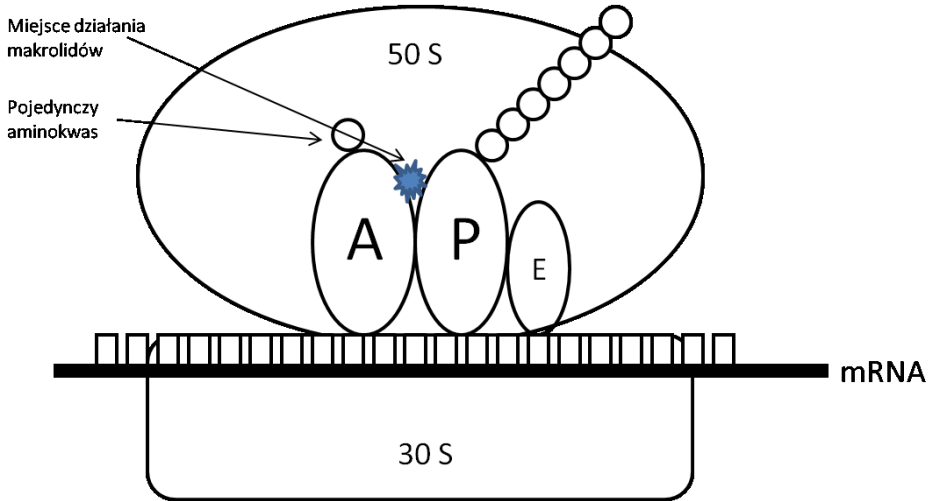
	tylozyna A	tylozyna B	tylozyna C	tylozyna D	dihydrodezozamina
R <sub>1</sub>	-CHO	-CHO	-CHO	-CH <sub>2</sub> OH	-CH <sub>2</sub> OH
R <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>
R <sub>3</sub>	-Mykaroza	-H	-Mykaroza	-Mykaroza	-H



grupa wykorzystywana do wiązania antybiotyku z podjednostką rybosomu 50S

Rys 2. Budowa strukturalna różnych form tylozyny [20].

Makrolidy wykazują działanie bakteriostatycznie. Wpływają hamująco na syntezę białek przez blokowanie podjednostki 50S rybosomu. Uniemożliwiają translokację nowo tworzonego łańcucha peptydowego z miejsca A do P. Przypuszcza się, że mogą łączyć się z prekursorami podjednostki 50S rybosomu, przez co uniemożliwiają powstawanie nowego rybosomu [21, 22].



Rys 3 Schemat przedstawiający mechanizm działania makrolidów. (Opracowanie własne)

Rybosom bakteryjny składa się z dwóch podjednostek 30S oraz 50S. Podjednostka 30S wiąże nić mRNA i odpowiada za odpowiednie dekodowanie następujących po sobie kodonów łańcucha mRNA, co wpływa na dokładność translacji. W podjednostce 50S znajdują się miejsca: A – aminoacylowe, P – peptydowe i E – wyjście. W miejscu A przyłącza się tRNA komplementarne do tripletu znajdującego się na mRNA, niosący odpowiedni aminokwas. Między aminokwasem znajdującym się w miejscu A i łańcuchem aminokwasowym powstającym na miejscu P tworzy się wiązanie peptydowe. Łańcuch przesuwa się na miejsce A, a następnie przeskakuje wraz z nowo dołączonym aminokwasem na miejsce P czemu towarzyszy równoczesne przemieszczenie nici mRNA o jeden kodon. Taka sytuacja powtarza się do momentu pojawienia się tripletu terminującego (UAA, UAG, UGA), co warunkuje zakończenie tworzenia białka [23].

## 2.1. Makrolidy w lecznictwie i w weterynarii

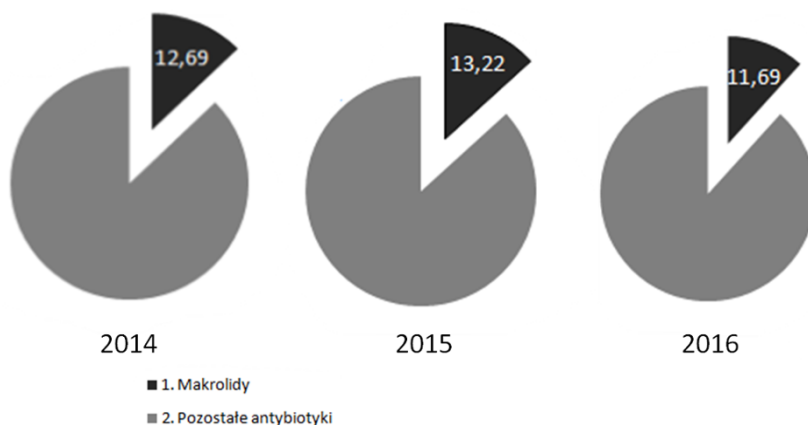
Makrolidy działają na wybrane bakterie:

- Gram-dodatnie (G(+)) z rodzajów: *Streptococcus* *Staphylococcus*;
- Gram-ujemne (G(-)) z rodzajów: *Neisseria*, *Moraxella*, *Bordetella*, *Haemophilus*;
- patogeny atypowe: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* i *Legionella pneumophila*.

W terapii ludzi, makrolidy stosowane są najczęściej w:

1. Chorobach infekcyjnych górnych dróg oddechowych (zapalenie gardła, migdałków, uszu, ostre i przewlekłe zapalenie błony śluzowej nosa i zatok przynosowych).
2. Chorobach infekcyjnych dolnych dróg oddechowych (zapalenie oskrzeli i tchawicy, zapalenia płuc (wewnątrzszpitalne i pozaszpitalne).
3. Mukowiscydozie.
4. Astmie.
5. Innych przewlekłych chorobach dróg oddechowych (przewlekłe bakteryjne zapalenie oskrzeli, pierwotna dyskineza rzęsek).
6. Zakażeniach dróg oddechowych wywołanych przez mykobakterie niegruźlicze [24].

W przypadku leków przeciwbakteryjnych stosowanych w weterynarii, procentowa konsumpcja poszczególnych grup leków wygląda nieco inaczej: pierwsze miejsce zajmują tetracykliny, penicyliny znajdują się na drugim miejscu a makrolidy – na trzecim miejscu. Inne rodzaje antybiotyków są przepisywane w znacznie mniejszej ilości [25]. W Polsce, w ciągu ostatnich lat konsumpcja makrolidów praktycznie nie zmienia się [Rys. 4].



Rys. 4 Procentowy udział makrolidów w stosunku do pozostałych leków przeciwbakteryjnych. [Na podstawie [25]]

## 2.2. Tylozyna

### 2.2.1. Właściwości fizykochemiczne

W środowisku obojętnym i alkalicznym tylozyna A ulega rozkładowi a produktami są m.in. tylozyna B i tylozyna aldolowa. W środowisku kwaśnym głównym produktem degradacji jest tylozyna B. Pod działaniem światła dziennego, tylozyna ulega fotoizomeryzacji tworząc izotylozynę A (izoTA) [26, 27].

### 2.2.2. Właściwości farmakologiczne

W Polsce, tylozyna jest stosowana wyłącznie w weterynarii. W naturalnym środowisku jest produkowana przez szczep *Streptomyces fradiae* i występuje jako mieszanina składająca się z czterech form: tylozyny A, tylozyny B, tylozyny C

i tylozyny D. Głównym składnikiem mieszaniny jest tylozyna A (>80%). Względna aktywność przeciwdrobnoustrojowa pochodnych tylozyny jest następująca: tylozyna A=1,0, tylozyna B=0,83, tylozyna C=0,75 natomiast tylozyna D=0,35 [28].

Jej aktywność jest skierowana przeciwko bakteriom G(+), niektórym bakteriom G(-) oraz mykoplazmie. Znalazła zastosowanie w leczeniu zakażeń u bydła, owiec, kóz, świń oraz drobiu [29].

Do zakażeń wywołanych przez mikroorganizmy wrażliwe na działanie tylozyny należą:

- u bydła – infekcje układu oddechowego i zapalenie macicy powodowane przez bakterie G(+), zapalenie wymion wywołane przez *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. lub *Mycoplasma*, ropowica skóry szpary międzyczracicznej, zastrzał lub zanokcica;
- cielęta – infekcje dróg oddechowych i nekrobacilozy;
- trzoda chlewna – enzootyczne zapalenie płuc, krwotoczne zapalenie jelit, różycyca i zapalenie macicy, zapalenie stawów wywołane przez *Mycoplasme* i *Staphylococcus*,
- u owiec i kóz – infekcje układu oddechowego oraz zapalenie macicy wywołane przez bakterie G(+) i zapalenie wymienia powodowane przez bakterie G(+) lub *Mycoplasme*;
- drób – schorzenia układu oddechowego i zapalenie zatok. (antybiotyk stosuje się wyłącznie w postaci proszku dodawanego do paszy, iniekcje domięśniowe mogą skończyć się zgonem) [29].

U zwierząt monogastrycznych a także u drobiu, tylozyna szybko wchłania się z przewodu pokarmowego. Po podaniu doustnym maksymalne stężenie tylozyny w osoczu występuje po 1-4 godzinach. doustna biodostępność tylozyny jest umiarkowana i wynosi około 22% u świń i 30-34% u kurcząt). Tylozyna jest słabą zasadą organiczną (pKa 7,73) o dobrej rozpuszczalności w tłuszczach, dzięki czemu jest dobrze rozprowadzana do narządów i tkanek zwierząt [30]. Główny metabolizm tylozyny zachodzi w wątrobie. W wątrobie świni wyizolowano co najmniej 4 metabolity tylozyny, w tym tylozynę C natomiast w wątrobie indyków wykryto tylozynę D [31]. U szczurów i świń większość metabolicznej pozostałości tylozyny(99%) jest wydalana z kałem, a tylko 1% z moczem. Produkty metabolizmu tylozyny dostają się wraz z odchodami do naturalnych nawozów a następnie przenikają do wód powierzchniowych [15, 25].

### 2.2.3. Pozostałości tylozyny w środowisku

Pozostałości tylozyny wykryto w 82% analizowanych próbek wód powierzchniowych, przy czym maksymalne stężenie wynosiło 0,06µg/l [9]. W trwających 3 lata (2013-2015) badaniach dotyczących obecności farmaceutyków w rzece Iowa (USA), stwierdzono, że tylozyna była obecna w 37 – 100% próbek, w stężeniu 0,30 ng/l. Również bardzo niskie stężenia tego leku występowały w próbkach wody pobranych z dorzecza rzeki Ebro (Hiszpania) natomiast w próbkach osadu – przeciwnie- były wysokie (71 ng/g). Wskazuje to, że tylozyna jest prawdopodobnie mocno zaabsorbowana w osadach dennych i nie jest przenoszona w wodach płynących na większe odległości W świńskiej gnojowicy, stężenie tylozyny A mieściło się w granicach 0,4-4,9 µg/l [32]. Z kolei, w lagunach dla świń stężenia tylozyny B i D było na poziomie od 50 do 1700 mg/l i od 15 do 270 mg/l [33]. Zmierzone stężenia antybiotyków w glebie są często znacznie mniejsze, jeśli

występują w ogóle, niż w oborniku. [34-36] Stężenie tylozyny A w glebie nawożonej gnojownicą wynosiło od 25 do 50 mg/g (w Danii) [34].

Sorpcja tylozyny na koloidach gleby silnie zależy od jej pH, zawartości w niej gliny oraz zdolności kationowymiennej gliny. Tylozyna jest związkiem rozpuszczalnym w wodzie o dość wysokiej masie cząsteczkowej (916 g/mol). Z tych powodów praktycznie nie zachodzi jej sorpcja na drodze np. penetracji mikroporów gleby. W zakwaszonej glebie, znaczna ilość tylozyny występuje w postaci cząstek o ładunku dodatnim co wpływa na ich silne wiązanie z ujemnie naładowaną powierzchnią osadów [37]. Tylozyna ma wysokie powinowactwo dla cząstek osadu, z czasem aktywnego przebywania wynoszącym 100 dni. Tak długie występowanie tego leku w swej aktywnej formie może negatywnie wpłynąć na populacje bentoniczne. Dane literaturowe wskazują, że sorpcja tylozyny zmniejsza się ze wzrostem siły jonowej z powodu – wynikającej z niej – zmiany pH oraz w wyniku konkurencji pomiędzy kationami obecnymi w roztworze gleby (np.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) i dodatnio naładowanymi cząstkami tylozyny o ujemnie naładowane cząstki gleby [38].

### 3. Test MARA<sup>®</sup>

Do oceny aktywności biologicznej produktów powstałych w wyniku biodegradacji tylozyny mogą służyć testy ekotoksykologiczne. Ich działanie opiera się na założeniu, że odpowiedź wybranych organizmów testowych, które są narażone na działanie szkodliwych związków jest podobna do reakcji jaka może wystąpić u innych organizmów zasiedlających dany ekosystem. Przykładem takiego testu jest wielogatunkowy test MARA<sup>®</sup> (*Microbial Assay for Risk Assessment*). Wykorzystuje się w nim 10 szczepów bakterii i 1 szczep drożdży. Zastosowanie w jednym teście różnej pod względem taksonomicznym grupy mikroorganizmów zwiększa jego czułość ponieważ wzrasta prawdopodobieństwo, że choć jeden badanych szczepów będzie wrażliwy na działanie próbki środowiskowej. Szczegółowy opis wykonania testu znajduje się m.in. w pracy [39].

### 4. Cel pracy

Celem badań było określenie kinetyki aerobowej biodegradacji tylozyny w odcieku z gleby z pola uprawnego i w osadzie czynnym z oczyszczalni ścieków a także identyfikacja produktów powstałych w tym procesie oraz ocena ekotoksyczności powstałych produktów wobec mikroorganizmów (test MARA<sup>®</sup>).

### 5. Materiały i metody

Odczynniki:

- acetonitryl ( $\text{AcCN}$ ) do HPLC, POCh Gliwice;
- kwas mrówkowy ( $\text{HCOOH}$ ) do HPLC, >98%, Sigma-Aldrich;
- winian tylozyny, potencjał 7800 jednostek/mg, Sigma-Aldrich;
- 1% roztwór chlorku 2,3,5-trifenylotetrazolowego (chlorek tetrazoliny), cz.d.a., POCh Gliwice;
- pepton sojowy (peptone from soybean meal), FlukaAnalytical;
- nadmanganian potasu ( $\text{KMnO}_4$ ), cz.d.a., POCh Gliwice;
- woda redestylowana;
- węgiel aktywny, Polfarma;

**Materiały:**

- osad czynny z komory tlenowej z oczyszczalni ścieków „Radocha” w Sosnowcu;
- gleba bielkowa z terenów rolniczych w Jastrzębiu Zdroju, współrzędne miejsca poboru próbki: 49°57'19"N, 18°34'29"E.

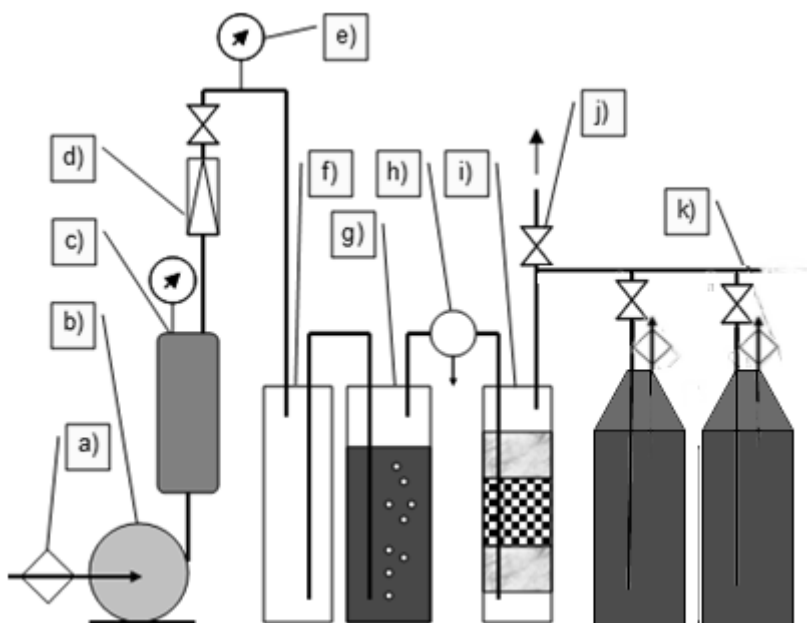
**Aparatura i sprzęt laboratoryjny:**

- chromatograf HPLC YL 9100 (Vacuum Degasser YL9101, Binary Pump YL9111, Column Compartment YL 9130, UV/Vis Detector YL9120), Young Lin Instrument Co., Ltd., Korea;
- kolumna HypersilC-18, 150 x 2,1 mm; faza ruchoma CH<sub>3</sub>CN – 70% i H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o pH 2,7-30%; przepływ 1 cm<sup>3</sup>/min;
- spektrometr masowy MS-TOF ES+ (zestaw UPLC/DAD i Xevo G2-XS-QTOF, Waters);
- kolumna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, przepływ 0,35 cm<sup>3</sup>/min)
- waga analityczna (AS60/C/2, max. 60 g, RADWAG, Warszawa);
- wirówka laboratoryjna, Centrifuge MPW-223e, Zakłady WPW Med. Instruments;
- łoża laminarna ALPINA K1600 (pionowy, laminarny przepływ powietrza, 2 filtry HEPA o wydajności 99,999% dla cząstek o średnicy >3 μm, lampa UV)
- pipeta automatyczna wielokanałowa Transferpette® -12, Brand;
- inkubator (cieplarka) ZIIU1207, TIGRET;
- filtry strzykawkowe 0,2 μm z membraną RC, sterylne;
- kompresor bezolejowy B110 ARIOSTO, Gentilin;
- skaner fotograficzny Skanjet G4050, HP;
- zestaw naczyń ze szkła oranżowego o pojemności 2,5 L do przeprowadzania procesu biodegradacji;
- płytki titracyjne MARA® z liofilizowanymi kulturami mikroorganizmów.

### **5.1. Przygotowanie próbek do badań**

W przeprowadzonym badaniu jako substancję czynną wykorzystano winian tylozyny. Jako matryce środowiskowe zastosowano odciek z gleby oraz osad czynny z komory tlenowej oczyszczalni ścieków.

Na początku przygotowano odciek gleby po przez zmieszanie równych objętości gleby oraz wody destylowanej. Mieszaninę dokładnie wymieszano i odstawiono do sedymentacji na ok. 12 godzin. Po opadnięciu gleby, roztwór z nad osadu zdekantowano. Zarówno do osadu czynnego jak i do odcieku glebowego dodano roztwór tylozyny o stężeniu 200 mg/ml. Zastosowane stężenie leku ustalono na podstawie wcześniejszych badań. Próbki osadu i odcieku glebowego (ok. 2 l) umieszczono w 2,5 litrowych butlach wykonanych ze szkła oranżowego. Schemat zestawu do prowadzenia biodegradacji przedstawiono poniżej.



Rys. 5 Wyposażenie wykorzystywane do biodegradacji:

- a) filtr HEPA, b) kompresor bezolejowy, c) zbiornik, d) zawór redukcyjny, e) manometr, f) zbiornik bezpieczeństwa, g) płuczka z roztworem KMnO<sub>4</sub>, h) separator, i) absorber z węglem aktywnym, j) zawór, k) butle ze szkła oranżowego

Parametry przeprowadzanego procesu:

- Czas eksperymentu: 53 dni;
- Temperatura: 23°C;
- Warunki procesu: aerobowe;

## 5.2. Część I Analiza HPLC

Zmiany stężenia tylozyny w czasie w wyniku biodegradacji rejestrowano za pomocą chromatografu HPLC. W analizie chromatogramów wykorzystano program YL Clarity v3.0. Każdy chromatogram porównywano z chromatogramem wzorcowego roztworu tylozyny.

Skład fazy ruchomej podano w poniższej tabeli:

Tabela I Skład fazy ruchomej

Czas (min) \ Skład (%)	0,1% HCOOH w wodzie (%)	0,1% HCOOH w AcCN, (%)
0	80	20
3	50	50
4	50	50
4,5	80	20
8	80	20



### 5.3. Część II Analiza MS-TOF ES+

Identyfikację produktów biodegradacji tylozyny dokonano za pomocą spektrometru masowego MS-TOF ES+: przepływ 0,35 ml/min, temperatura 30 °C. Analiz widm była przeprowadzona za pomocą programu MassLynx V4.1.

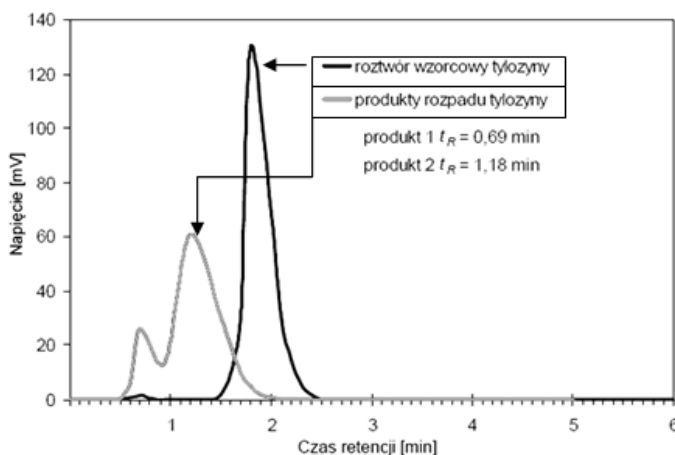
### 5.4. Część III Test MARA®

Miarą toksyczności próbek środowiskowych wobec mikroorganizmów testowych w teście MARA® jest zahamowanie ich metabolizmu po 24 godzinnej inkubacji. Do jednego z rzędów (A) wprowadza się wyłącznie pożywkę i bakterie, bez dodatku próbki środowiskowej. Ten rząd traktuje się jako tzw. kontrolę. W pozostałych rzędach wykonywano szereg rozcieńczeń badanej próbki środowiskowej. Maksymalne stężenie jest w rzędzie G a minimalne w rzędzie B (Rys.9). Płytki są skanowane a ich obraz poddaje się analizie za pomocą programu MARA®. Do pożywki mikroorganizmów z próbką środowiskową dodawany jest barwnik (czerwień tetrazolinowa). Jest on redukowany przez żywe mikroorganizmy (w dołkach na płytce pojawia się czerwona barwa a na skanie – ciemnoszara), a w ich nieobecności próbka pozostaje bezbarwna. (jasne plamki na płytce).

Procedurę przygotowania jałowych roztworów (barwnika, peptonu sojowego), „wzbudzenia” i „szczepienia” płytek oraz ich inkubację, wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną do testu i zamieszczoną również w publikacji [39]. Analizę ilościową przeprowadzono z użyciem oprogramowania MARA®.

## 6. Omówienie wyników

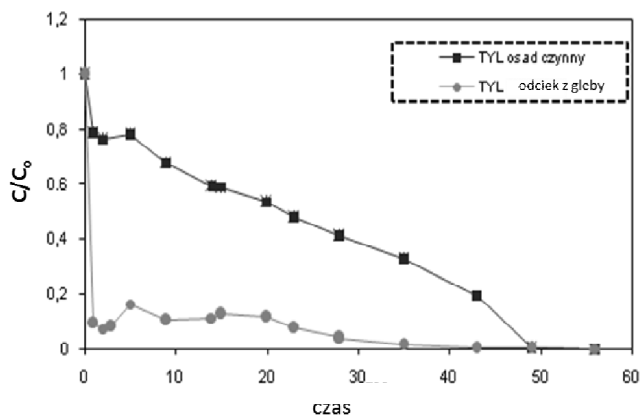
Pierwszym etapem badań była ocena trwałości roztworu tylozyny w wodzie redestylowanej w warunkach septycznych. Doświadczenie trwało 28 dni i wykazało, że stężenie tego związku praktycznie nie zmieniło się. W dalszej części badań wykonano doświadczenie nad biodegradacją tylozyny (w warunkach tlenowych) w obecności osadu czynnego z oczyszczalni ścieków. Już po 24 godzinach, na chromatogramach zaobserwowano pojawienie się dwóch pików o czasach retencji ( $t_R$ ) różnych od czasu retencji pików wzorcowego roztworu tylozyny (Rys. 6).



Rys 6 Porównanie chromatografów roztworu tylozyny w osadzie czynnym w warunkach tlenowych po 24 godzinach oraz wzorcowego roztworu tego leku

Wskazuje to, że tylozyna uległa biodegradacji w osadzie czynnym i powstały przynajmniej dwa produkty. Oba produkty charakteryzowały się znaczną trwałością, ponieważ były rejestrowane na chromatogramach przez ponad 28 dni a ich stężenie praktycznie nie zmieniło się w ciągu pierwszych 20 dni (dane nie pokazane na rysunkach).

Kolejnym etapem badań było przeprowadzenie doświadczeń w których do odcieków z pola uprawnego oraz osadu czynnego dodano roztwór tylozyny o stężeniu  $200 \text{ mg/dm}^3$ . Celem tych doświadczeń było zidentyfikowanie produktów biodegradacji leku powstających w różnych typach próbek środowiskowych. Eksperyment prowadzono przez 53 dni. Zmiany stężenia tylozyny w obu rodzajach próbek przedstawiono na rysunku Rys 7.

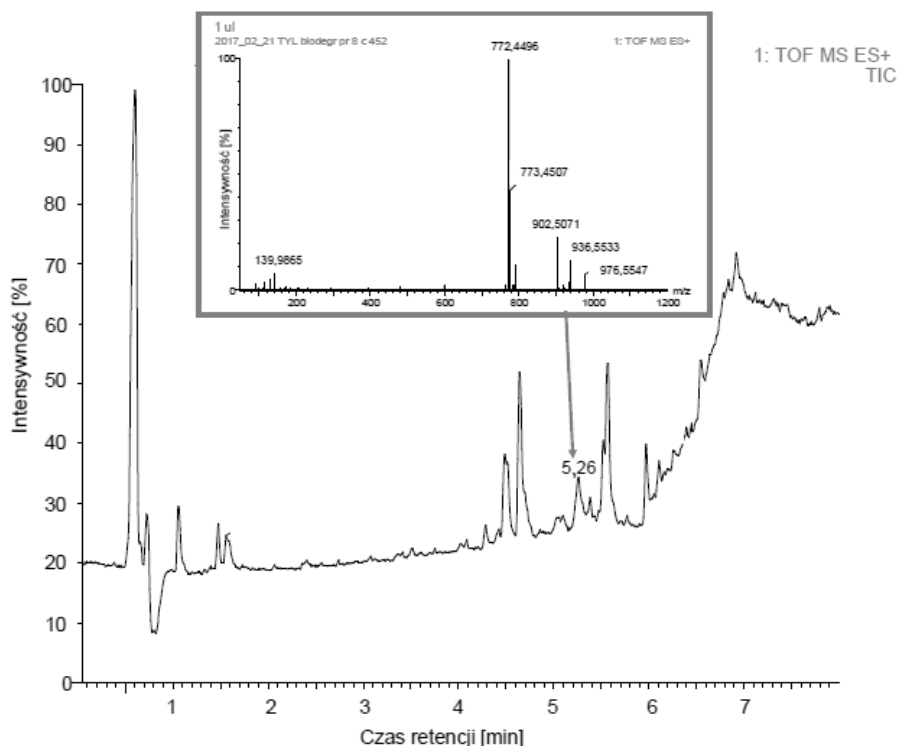


Rys 7. Wykres przedstawiający zależność stężenia tylozyny ( $C_0 = 200 \text{ mg/dm}^3$ ) w pobieranych próbkach od czasu eksperymentu

Z uwagi na użycie w doświadczeniu wysokiego stężenia leku, w próbkach osadu czynnego biodegradacja rozpoczęła się po wstępnym okresie adaptacji trwającym około 5 dni. Całkowity rozkład tylozyny miał miejsce po 49 dniach.

W próbkach odcieku z pola, już po pierwszym dniu zaobserwowano około 90% zmniejszenie stężenia tylozyny. Najbardziej prawdopodobną przyczyną była sorpcja leku na cząstkach gleby (wstęp, rozdział 1 niniejszej monografii) a nie jego biodegradacja. Rozkład pozostałych 10% tylozyny miał miejsce po 43 dniach eksperymentu.

Na rysunku 8 przedstawiono chromatogram i widmo masowe próbki odcieku z pola uprawnego (z dodaną tylozyną) po 53 dniach eksperymentu.



Rys 8. Chromatogram i widmo MS-TOF (w górnej części rysunku) napowietrzanego odcieku glebowego z dodatkiem tylozyny

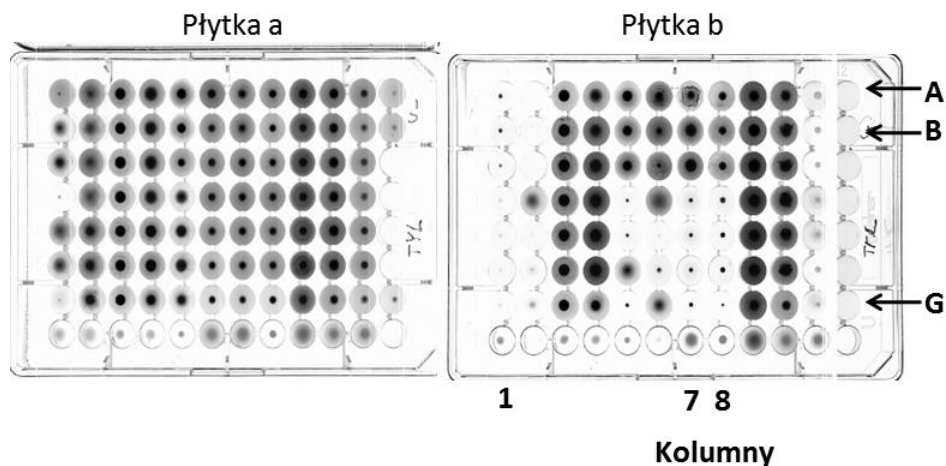
W tabeli 1 umieszczono zidentyfikowane (wzory sumaryczne i nazwy) związki, które występowały w próbce odcieku z pola (z dodatkiem tylozyny) po 53 dniach biodegradacji.

Spśród czterech form tylozyny, zidentyfikowano tylko tylozynę B (Tabela II, lp.2) natomiast nie stwierdzono obecności pozostałych dwóch form czyli tylozyny C i tylozyny D. Zidentyfikowano również laktenocynę, mycynozę i 2-deoksy-2-(dime-tylamino)heksopiranozę czyli związki opisane w literaturze jako produkty biodegradacji tylozyny. Pozostałe zidentyfikowane związki są najprawdopodobniej produktami utlenienia laktenocyny lub pierścienia laktonowego. Na podstawie produktów biodegradacji tylozyny wymienionych powyżej można przypuszczać że proces ten przebiega poprzez eliminację cząsteczek cukrów. Analogiczne wnioski przedstawili także inni badacze [33].

Test MARA<sup>®</sup> umożliwił ocenę działania produktów biodegradacji tylozyny na poszczególne szczepy mikroorganizmów. Na rysunku 9 przedstawiono skany przykładowych płytek MARA<sup>®</sup> dla próbek osadu czynnego (a) i odcieku z pola uprawnego (b), do których dodano tylozynę i prowadzono biodegradację przez 53 dni.

Tabela II Związki zidentyfikowane po biodegradacji tylozyny w próbce zawierającej odciek glebowy

Lp.	Czas retencji [min]	Oznaczona wartość m/z [M+H <sup>+</sup> ]	Prawdopodobny wzór	Teoretyczna wartość m/z [M+H <sup>+</sup> ]	Prawdopodobna nazwa zidentyfikowanej substancji 1
1	6,14	916,5256	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	916,5270	tylozyna A
2	5,26	772,4496	C <sub>39</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>14</sub>	772,4483	tylozyna B
3	5,38	758,4290	C <sub>38</sub> H <sub>63</sub> NO <sub>14</sub>	758,4327	Pochodna tylozyny B
4	4,52	628,3333	C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>12</sub>	628,3333	pochodna laktenocyny
5	4,49	614,3549	C <sub>31</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>11</sub>	614,3540	pochodna laktenocyny
6	4,29	614,3549	C <sub>31</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>11</sub>	614,3540	pochodna laktenocyny
7	5,00	612,3070	C <sub>31</sub> H <sub>47</sub> O <sub>12</sub>	612,3146	pochodna laktenocyny
8	6,26	598,3597	C <sub>31</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>10</sub>	598,3591	laktenocyna
9	5,57	437,2049	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	437,2175	pochodna makrocyklicznego pierścienia laktonowego
10	0,72	208,1190	C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	208,1185	2-deoksy-2-(dimetylamino)heksopiranoza
11	6,92	193,1007	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	193,1076	mycynoza

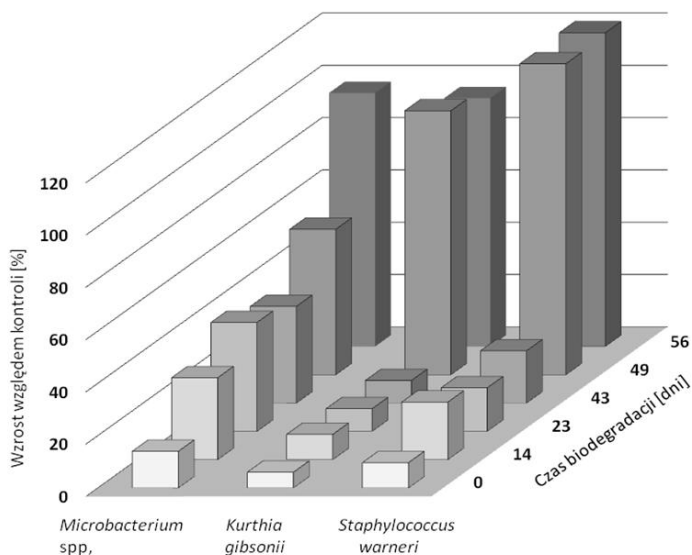


Rys. 9. Płytki MARA<sup>®</sup> przedstawiające wrażliwość mikroorganizmów na badane związki (a) – osad czynny, (b) – odciek z gleby

Użyte w teście MARA<sup>®</sup> mikroorganizmy w różny sposób reagowały na obecność produktów biodegradacji tylozyny. W przypadku próbek osadu czynnego, praktycznie nie stwierdzono zahamowania wzrostu żadnego z 11 badanych szczepów

(Rys. 9a, ciemne plamki w każdej kolumnie). Z kolei, w przypadku produktów biodegradacji tylozyny w odcieku z pola uprawnego, najbardziej wrażliwymi na ich działanie były *Microbacterium* spp, *Staphylococcus warneri* i *Kurthia gibsonii* (Rys. 9b, jasne plamki w kolumnach 1,7 i 8). Wzrost pozostałych szczepów praktycznie nie był zahamowany.

W celu lepszego porównania działania produktów biodegradacji tylozyny na szczepy testowych mikroorganizmów, wartości tzw. Microbial Toxic Concentration (wyliczane za pomocą programu MARA<sup>®</sup>) przeliczono w ten sposób, że aktywność mikroorganizmów w próbkach kontrolnych (bez dodatku leku) przyjmowano za 100%.



Rys. 10. Toksyczność tylozyny i jej metabolitów powstałych w procesie biodegradacji wobec 3 najbardziej wrażliwych mikroorganizmów testowych/dla próbek z odcieku z pola uprawnego.

Przeciwdrobnoustrojowe działanie produktów biodegradacji tylozyny wobec *Kurthia gibsonii* i *Staphylococcus warneri* obserwowano nawet po 43 dniach trwania eksperymentu. Przejawiało się to zahamowaniem wzrostu tych szczepów bakteria wzrost mierzony względem próbek kontrolnych sięgał 20%. Po tym okresie adaptacyjnym, aktywność metaboliczna mikroorganizmów zwiększyła się do wartości takiej jak w próbkach kontrolnych.

## 7. Wnioski

Roztwory tylozyny o stężeniu 200 mg/l dodane do próbek osadu czynnego z oczyszczalni ścieków powodowały – początkowo – zahamowanie wzrostu mikroorganizmów środowiskowych. Po 5 dniach adaptacji miało miejsce powolne zmniejszanie stężenia leku co świadczyło o zachodzącym procesie biodegradacji. Całkowity rozkład leku zarejestrowano po 49 dniach. Niektóre produkty biodegradacji tylozyny w osadzie czynnym charakteryzowały się znaczną trwałością (ich stężenie nie zmieniało się w ciągu pierwszych 20 dni). W próbkach odcieku z pola zachodziła silna sorpcja

leku na cząstkach gleby (na poziomie 90%), natomiast biodegradacja pozostałej frakcji leku trwała 20 dni. W pełni zidentyfikowano sześć spośród jedenastu zarejestrowanych produktów biodegradacji tylozyny. W ekotoksykologicznym teście MARA, trzy spośród jedenastu szczepów były wrażliwe na działanie produktów biodegradacji tylozyny w odcieku z pola uprawnego.

## Literatura

1. Andersson D.I., Hughes D., *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?*. Nature Reviews Microbiology, 8 (2010), s. 260.
2. [http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/Consumption\\_ESAC-Net\\_Summary-2015\\_PL\\_2015-11.pdf](http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/Consumption_ESAC-Net_Summary-2015_PL_2015-11.pdf)
3. Eggleston K, Zhang R., Zeckhauser R. J., *The global challenge of antimicrobial resistance: insights from economic analysis*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 7 (2010), s. 3141-3149.
4. Przeniosło-Siwczyńska M., Kwiatek K., *Dlaczego zakazano stosowania w żywieniu zwierząt antybiotyków stymulatorów wzrostu?*. Życie Weterynaryjne, 88 (2013), s. 104-108
5. Ternes T. A. *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Research, 32 (1998), s. 3245-3260.
6. Zounkova R., *Effects and Risks of Pharmaceuticals in the Environment. Diss.*, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, (2010)
7. Langford K. H., Kevin V.T. *Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works*, Environment International 35 (2009), s. 766-770.
8. Kwon J. W., *Mobility of veterinary drugs in soil with application of manure compost*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 87 (2011), s. 40
9. Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin D. W., Costanzo S. D., *The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water*, Science of the Total Environment, 407 (2009), s. 2711-2723
10. Focazio M. J., Kolpin D. W., Barnes K. K., Furlong E. T., Meyer M. T., Zaugg S. D., Barber L. B., Thurman M. E., *A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—II) Untreated drinking water sources*, Science of the Total Environment, 402 (2008), s. 201-216.
11. García-Galán, M. J., Blanco S. G., Roldán R. L., Díaz-Cruz S., Barceló D., *Ecotoxicity evaluation and removal of sulfonamides and their acetylated metabolites during conventional wastewater treatment*, Science of the Total Environment, 437 (2012), s.403-412.
12. Bartelt-Hunt S., Snow D. D., Damon-Powell T., Miesbach D., *Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities*, Journal of Contaminant Hydrology, 123 (2011), s. 94-103.
13. Awad Y. M., Kim S. C., El-Azeem S. A. A., Kim K. H., Kim K. R., Kim K., Choong J., Sang S. L., Yong S. O. *Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility*. Environmental Earth Sciences 71 (2014), s.1433-1440
14. Słownik terminów biologicznych PWN:  
<http://stareaneksy.pwn.pl/biologia/1.php?id=1468431> (dostęp z dnia 10.04.2018)
15. Nikolaou A., Meric S., Fatta D., *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387, (2007) s.1225-1234

16. Dudziak M., Luks-Betlej K., *Ocena obecności estrogenów – steroidowych hormonów płciowych w wybranych wodach rzecznych w Polsce*, *Ochrona Środowiska* 26, (2004), s.21-24
17. Miller J. H., Novak J. T., Knocke W. R., Pruden A., *Survival of antibiotic resistant bacteria and horizontal gene transfer control antibiotic resistance gene content in anaerobic digesters*, *Frontiers in Microbiology* 7 (2016), s. 263.
18. Bouki C., Venieri D., Diamadopoulos E., *Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91 (2013), s.1-9
19. Zejc A., Gorczyca M. *Chemia leków. Podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, (2013), s. 682-686.
20. Hoffmann, J., & Hoffmann, K. *Zrównoważony rozwój w produkcji nawozów*. *Przemysł Chemiczny*, 82 (2003), s. 837-839.
21. Dzierżanowska D., *Antybiotykoterapia praktyczna*, Wydawnictwo e-medicaPress. Wydanie IV, (2008), s. 134-143
22. Kostowski W., Herman Z. S., *Farmakologia Podstawy farmakoterapii - Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Wydanie III, T II, (2010), s. 324-332.
23. Trylska J., *Budowa przestrzenna i działanie rybosomu bakteryjnego*. nagroda nobla z chemii 2009. Kosmos 1 (2010), s. 9-16.
24. Emeryk A, Mazurek H, Pirożyński M., Klatka J., Służewski W., Antczak A., Bartkowiak-Emeryk M., Kowalska M., Dutkowska A. *Macrolide antibiotics in respiratory diseases. Recommendations of the Polish Expert Group — AD 2015*. *Advances in Respiratory Medicine* 84, (2016), s. 62-80.
25. Krasucka D., Biernacki B., Szumilo J., Burmanczuk J., *Monitoring zużycia leków przeciwdrobnoustrojowych u bydła, trzody chlewnej i koni w Polsce w latach 2014-2016 na podstawie Programu Wieloletniego*, *Życie Weterynaryjne* 92, (2017).
26. Paesen J., Cypers W., Pauwels E., Roets J., Hoogmartens J. *Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 13, (1995a), s. 1153-1159.
27. Paesen J., Cypers W., Busson R., Roets J., Hoogmartens J., *Isolation of decomposition products of tylosin using liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A* 699 (1995c), s. 99-106.
28. Teeter J.S., Meyerhoff R.D., *Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta*, *Environmental Research*, 93 (2003), s. 45-51.
29. Karta charakterystyki produktu leczniczego tylozyna: [http://plw.urpl.gov.pl/files/PHARMASIN\\_charakterystyka.pdf](http://plw.urpl.gov.pl/files/PHARMASIN_charakterystyka.pdf) (dostęp z dnia 10.04.2018).
30. Burrows G.E., Barto P.B., Martin B., Tripp M.L., *Comparative pharmacokinetics of antibiotics in newborn calves: chloramphenicol, lincomycin, and tylosin*, *American Journal of Veterinary Research*, 44 (1983), s. 1053-1057.
31. Montesissa C., De Liguoro M., Santi A., Capolongo F., Biancotto G., *Tylosin depletion in edible tissues of turkeys*, *Food Additives and Contaminants*, 16 (1999), s. 405-410
32. Dolliver, H., Gupta, S., Satish. *Antibiotic losses in leaching and surface runoff from manure-amended agricultural land*, *Journal of Environmental Quality*, 37 (2008), s. 1227-1237
33. Kolz A. C., Moorman T. B., Ong S. K., Scoggin K. D., Douglass E. A., *Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons*, *Water Environment Research*, 77 (2005), s. 49-56.
34. Halling-Sørensen B., Jacobsen A. M., Jensen J., Sengeløv G., Vaclavik E., Ingerslev F., *Dissipation and effects of chlortetracycline and tylosin in two agricultural soils: A*

- field-scale study in southern Denmark*, Environmental Toxicology and Chemistry, 24 (2005), s. 802-810.
35. Martínez-Carballo E., González-Barreiro C., Scharf S., Gans O., *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*, Environmental Pollution, 148 (2007), s. 570-579
  36. Zhou Z., Raskin L., Zilles J. L., *Effects of swine manure on macrolide, lincosamide, and streptogramin B antimicrobial resistance in soils*, Applied and Environmental Microbiology, 76 (2010), s. 2218-2224.
  37. Wegst-Uhrich S. R., Navarro D. A., Zimmerman L., Aga D. S., *Assessing antibiotic sorption in soil: a literature review and new case studies on sulfonamides and macrolides* Chemistry Central Journal 8 (2014), s. 5
  38. terLaak TL, Gebbink WA, Tolls J: *The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil*. Environmental Toxicology and Chemistry 25 (2006), s. 904-911.
  39. Nałęcz-Jawecki G., Wadhia K., Adomas B., Piotrowicz-Cieślak, A. I., Sawicki, J., *Application of microbial assay for risk assessment biotest in evaluation of toxicity of human and veterinary antibiotics*, Environmental Toxicology, 25 (2010), s. 487-494.

## **Badanie biodegradacji tylozyny w próbkach środowiskowych**

### Streszczenie

Tylozyna to antybiotyk z grupy makrolidów stosowany wyłącznie u zwierząt hodowlanych. Jej aktywność skierowana jest przeciwko szeregu drobnoustrojów: Gram (-), Gram (+) oraz mykoplazmie. Celem badania było określenie efektywności procesu biodegradacji tylozyny, określenie kinetyki tego procesu oraz próba identyfikacji jego produktów. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem matryc środowiskowych, pozyskanych z gruntów uprawnych oraz osadu czynnego pochodzącego komory aerobowej oczyszczalni ścieków. W napowietrzanych bioreaktorach umieszczono w/w próbki środowiskowe oraz wzorcowy roztwór tylozyny o znanym stężeniu. W założonych odstępach czasu pobierano próbki, które analizowano metodą UPLC-MS z wykorzystaniem detektora Q-TOF. Na podstawie zmian stężenia tylozyny wyznaczono kinetykę badanego procesu. Ponadto na podstawie monoizotopowych mas cząsteczkowych zidentyfikowano kilka produktów biodegradacji antybiotyku. Za pomocą testu MARA<sup>®</sup> dokonano oceny toksyczności chronicznej produktów biodegradacji tylozyny w próbkach środowiskowych.

Słowa kluczowe: tylozyna, biodegradacja, gleba.

## **Study on the tylosin biodegradation in environmental samples**

### Abstract

Tylosin is an antibiotic from macrolide group which is used to breeding animals only. Its activity is directed against many microorganisms, for example Gram (-) bacteria, Gram (+) bacteria and mycoplasma. The aim of this study was to evaluate the efficiency of tylosin biodegradation process, to the kinetics of this process and to identify its products. The study was conducted using environmental matrices obtained from cultivated soil and active sludge from the aerobic chamber of the wastewater treatment plant. Those environmental samples and standard solutions of tylosin with a known concentration were placed in aerated bioreactors. Aliquots were collected 3 times per week and were analyze during HPLC method and UPLC-MS method with a Q-TOF detector. The kinetics of biodegradation process was determined based on the changes of tylosin concentration. Moreover, some products of antibiotic biodegradation in cultivated soil were identified based on monoisotopic molecular masses. The chronic toxicity of tylosin biodegradation products in environmental samples was evaluated using the MARA<sup>®</sup> bioassay.

Keywords: tylosin, biodegradation, soil.



# Biologiczne przetwarzanie odpadów komunalnych w warunkach tlenowych i beztlenowych

## 1. Wprowadzenie

W Polsce od kilku lat można zaobserwować radykalne zmiany zachodzące w gospodarce odpadami. Zmiany te podyktowane są m. in. wytycznymi zawartymi w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008 r. w sprawie odpadów oraz uchylającej niektóre dyrektywy (Dz. Urz. UE L 312 z 22.11.2008, str. 3, z późn. zm.) [1]. Dyrektywa ta została transponowana do prawa polskiego w postaci ustawy o odpadach [2], a ta z kolei stanowi podstawę prawną Krajowego planu gospodarki odpadami 2022 (KPGO 2022) [3]. Zgodnie z wytycznymi KPGO 2022 Polska zobowiązana jest do ograniczenia ilości odpadów ulegających biodegradacji kierowanych na składowiska do 35 % do roku 2020 w odniesieniu do masy tych odpadów wytworzonych w 1995 r. [3, 4].

Odpady, które ulegają biodegradacji mogą być przetwarzane przy wykorzystaniu zarówno metod biologicznych, jak również termicznych. Ze względu jednak na wysoki poziom wilgotności frakcji odpadów, najkorzystniejsze jest zastosowanie procesów biologicznych [5]. Biologiczne przetwarzanie odpadów komunalnych może odbywać się w warunkach tlenowych (stabilizacja tlenowa/kompostowanie) bądź beztlenowych (fermentacja metanowa). W obu przypadkach wykorzystuje się procesy przemiany materii o charakterze mikrobiologicznym w celu rozkładu substancji organicznych zawartych w przetwarzanych odpadach w produkty, które z kolei mogą zostać zawrócone do naturalnego obiegu materii.

## 2. Stabilizacja tlenowa oraz kompostowanie

Pojęcie kompostowania odnosi się zarówno do przetwarzania odpadów ulegających biodegradacji zebranych selektywnie, jak również tych, wydzielonych jako frakcja podsitowa ze strumienia odpadów zmieszanych. W drugim przypadku mamy do czynienia jednak ze stabilizacją odpadów. W dalszej części rozdziału, dla uproszczenia, biologiczne przetwarzanie w warunkach tlenowych obu rodzajów odpadów określane będzie mianem kompostowania.

Celem kompostowania odpadów jest uzyskanie ustabilizowanego produktu bezpiecznego dla środowiska pod względem sanitarnym poprzez destrukcję organizmów uznawanych za patogenne dla ludzi, ale także dla zwierząt oraz roślin, do poziomu możliwie jak najmniejszego ryzyka wystąpienia chorób, które mogą być związane z zagospodarowaniem przetworzonych odpadów w przyszłości. Proces powinien być prowadzony w taki sposób, aby osiągnąć jak największy stopień rozkładu związków organicznych, które zawarte są w odpadach [6].

---

<sup>1</sup> marta.wisniewska.89@wp.pl, Katedra Ochrony i Kształtowania Środowiska, Wydział Instalacji Budowlanych, Hydrotechniki i Inżynierii Środowiska, Politechnika Warszawska.

Przetwarzając frakcję odpadów ulegających biodegradacji pochodzącą ze strumienia odpadów zmieszanych otrzymuje się produkt końcowy procesu w postaci stabilizatu. W przypadku kompostowania odpadów ulegających biodegradacji, ale wyłącznie selektywnie zebranych, teoretycznie otrzymuje się w wyniku zachodzącego procesu biologicznego kompost, który nie stanowi odpadu. W związku z tym przetwarzane w ten sposób odpady poddawane są procesowi odzysku, a nie jak w przypadku obróbki biologicznej frakcji podsitowej, procesowi unieszkodliwiania. Niestety nie zawsze w wyniku kompostowania otrzymuje się kompost niestanowiący odpadu. Jeżeli przetwarzane odpady nie były zbierane lub magazynowane we właściwy sposób bądź proces nie zachodził w odpowiednich warunkach, uwzględniając głównie takie parametry jak temperatura oraz wilgotność, produktem może być kompost nieodpowiadający wymaganiom, który jest odpadem możliwym do wykorzystania np. do rekultywacji składowisk, a nie jak w przypadku kompostu jako nawóz organiczny.

W trakcie trwania procesu kompostowania następuje rozkład związków organicznych na skutek czego uwalniany jest ditlenek węgla, woda oraz ciepło, a zatem jest to proces egzotermiczny. Szybkość oraz efektywność procesu zależą od takich parametrów jak:

- rodzaj przetwarzanych odpadów;
- obecność odpowiednich mikroorganizmów (bakterie, grzyby, promieniowce);
- ilość tlenu (>15%);
- odczyn pH (7,5-8,5);
- porowatość oraz wolna przestrzeń powietrzna (min. 30%);
- rozmiar cząstek wsadu (1,5-7,5 cm);
- stosunek węgla do azotu (25:1-35:1);
- poziom wilgotności (50-55%);
- temperatura (45-55°C).

Podane zakresy wartości wskazanych parametrów są wartościami optymalnymi i zależą od materiału wsadowego.

Cały proces kompostowania można podzielić na następujące fazy:

- fazę wstępnego kompostowania (faza mezofilowa bądź faza wzrostu temperatury) – czas trwania: do kilku dni,
- fazę intensywnego kompostowania (faza termofilowa bądź wysokotemperaturowa) – czas trwania: od kilku do kilkunastu tygodni,

W trakcie trwania tej fazy rozkładane są związki, które łatwo ulegają biodegradacji.

- fazę przemian (kompostowanie właściwe) – czas trwania: od trzech do pięciu tygodni.

Podczas fazy przemian, która rozpoczyna się w trzecim bądź maksymalnie w piątym tygodniu od momentu zainicjowania procesu, następuje spadek temperatury, jak również przekształcanie trudno rozkładających się związków przez bakterie mezofilne oraz grzyby, a także wyraźna redukcja objętości przetwarzanych odpadów [5].

## **2.1. Metody kompostowania**

W zależności od przyjętego kryterium można przyjąć różnoraki podział systemów kompostowania odpadów. W zależności od zastosowanej technologii możemy wyróżnić:

- kompostowanie w pryzmach;
- kompostowanie metodą mat;
- kompostowanie komorowe oraz kontenerowe;
- kompostowanie rzędowe oraz tunelowe;
- kompostowanie prowadzone w bębnach kompostowniczych;
- kompostowanie wieżowe;
- technologia Brikollare [5, 7].

Dostarczane do zakładów odpady zanim poddane zostaną procesowi kompostowania muszą zostać do tego odpowiednio przygotowane. W przypadku frakcji podsitowej proces przygotowawczy jest znacznie dłuższy niż ma to miejsce w przypadku odpadów ulegających biodegradacji zebranych selektywnie. Rozpa-trując odpady zmieszane w pierwszej kolejności powinny zostać wydzielone odpady surowcowe, czemu służą urządzenia w postaci separatorów oraz segregacja i doczyszczanie ręczne. Frakcja podsitowa, która w większości składa się z odpadów ulegających biodegradacji uzyskiwana jest poprzez przesianie przez sito o wielkości oczek najczęściej 0-60 mm bądź 0-80 mm.

Obróbka mechaniczna odpadów ulegających biodegradacji polega głównie na wydzieleniu często występujących worków oraz toreb, jak również innych zanieczyszczeń widocznych podczas kontroli wizualnej. Jeżeli występują odpady o dużych gabarytach, jak np. gałęzie, czy łodygi roślin, powinny zostać rozdrobnione, np. za pomocą rębaka. Schematy technologiczne obróbki mechanicznej są bardzo różne, tak jak i samych systemów kompostowania.

## **3. Fermentacja metanowa**

Fermentacja metanowa, tak jak kompostowanie, jest procesem mikrobiologicznym, ze względu na udział bakterii i prowadzi do rozkładu organicznych polimerów tłuszczu, białek oraz węglowodanów. Cały proces fermentacji zachodzi w warunkach beztlenowych, a zatem inne rodzaje bakterii biorą w nim udział (bakterie anaerobowe) niż podczas procesu kompostowania (bakterie aerobowe) [5, 8].

Cały proces fermentacji metanowej można podzielić na cztery fazy, tj.:

- hydroliza,

W trakcie trwania tej fazy następuje hydroliza białek, węglowodanów, w tym celulozy, do dwucukrów oraz monocukrów, a także hydroliza tłuszczu do alkoholi i małowcząstkowych lotnych kwasów tłuszczowych i wielowodorotlenowych kwasów tłuszczowych.

- kwasogeneza,

Faza ta nazywana jest także fazą zakwaszania. Ok. 76% produktów hydrolizy jest zamieniana w kwasy organiczne krótkołańcuchowe, ale także w alkohole (metanol, etanol), aldehydy, ditlenek węgla, wodór oraz siarkowodór. Niektóre powstałe związki mają charakter metanogeny i wykorzystywane są przez bakterie metanowe. Produkty kwasogenezy identyfikują się złowonnym charakterem.

- octanogeneza,

Faza acetogenezy zachodzi przy udziale bakterii, które zamieniają lotne kwasy tłuszczowe oraz etanol w kwas octowy, ditlenek węgla oraz wodór. Czas generacji bakterii acetogennych wynosi ok. 84 godziny.

- metanogeneza.

Podczas metanogenezy następuje produkcja metanu za pośrednictwem bakterii metanogennych. Metan powstaje z kwasu octowego (ok. 70%), wodoru oraz metanolu (lub metyloaminy lub siarczku di metylowego).

Każdy z poszczególnych etapów zachodzi w odpowiednich dla danej grupy bakterii warunkach. Intensywność oraz czas trwania procesu zależy od wielu czynników środowiskowych, a tylko stworzenie optymalnych warunków pozwala na uzyskanie oczekiwanych efektów. Do czynników tych zaliczamy:

- obecność odpowiednich mikroorganizmów;
- temperaturę (25-45°C – dla warunków mezofilowych);
- odczyn pH (6,9-7,4);
- obciążenie komory fermentacyjnej substancją organiczną (5 kg suchej substancji organicznej w 1 m<sup>3</sup> w ciągu doby);
- stosunek zawartości węgla do zawartości azotu 9 (od 10:1 do 25:1);
- zawartość suchej masy (22-40%);
- wielkość cząstek wsadu;
- homogenizację materiału.

Podane wartości dla wskazanych parametrów są wartościami optymalnymi dla prawidłowego prowadzenia procesu [5, 8].

Ze względu na temperaturę, w której prowadzony jest proces fermentacji wyróżniamy fermentację: psychrofilową prowadzoną przez bakterie psychrofilowe (aktywność bakterii w temperaturze 5-25°C), mezofilową z udziałem bakterii mezofilowych (aktywność bakterii w temperaturze 25-45°C) oraz termofilową inicjowaną przez bakterie termofilowe (aktywność bakterii w temperaturze 45-60°C). W celu przetwarzania odpadów komunalnych z reguły stosuje się fermentację mezofilową, gdyż płynie z niej najwięcej korzyści, rozpatrując efektywność procesu, łatwość obsługi procesu oraz możliwość utrzymania optymalnych warunków fermentacji. Innego podziału można dokonać na podstawie zawartości suchej masy w materiale wsadowym. Jeżeli zawartość suchej masy w substracie wynosi 6-15%, wówczas mówimy o fermentacji mokrej, zaś w przypadku zawartości suchej masy w granicach 20±2%, mówimy o fermentacji półsuchej. Najczęściej stosowana w celu obróbki biologicznej odpadów komunalnych jest jednak fermentacja sucha, do przeprowadzenia której wymagana zawartość suchej masy we wsadzie wynosi 22-40%.

Produktami końcowymi procesu fermentacji jest biogaz, składający się głównie z metanu i ditlenku węgla oraz tzw. poferment, który najczęściej poddawany jest procesowi dojrzwiania, tak jak w przypadku kompostowania. Zawartość metanu w biogazie jest dobrym identyfikatorem stabilności przebiegu całego procesu. Prawidłowo metan powinien stanowić 50-60% mieszaniny biogazu. Jeżeli następuje spadek zawartości metanu w gazie, fakt ten może świadczyć o mniejszej aktywności bakterii metanogennych oraz o zakłóceniu równowagi w układzie. Z biogazu może być produkowana energia elektryczna, a dojrzały poferment w przypadku wsadu

składającego się z odpadów ulegających biodegradacji zebranych selektywnie, może być wykorzystywany jako nawóz bądź środek wspomagający uprawę roślin. Sytuacja zmienia się, jeżeli materiałem wsadowym jest frakcja podsitowa pochodząca ze strumienia odpadów zmieszanych. Wówczas dojrzały poferment może zostać wykorzystany do rekultywacji terenów zdegradowanych lub zostać przekazany na składowisko [5, 8].

#### **4. Przegląd istniejących zakładów przetwarzania odpadów komunalnych w Polsce**

Zakłady przetwarzające odpady komunalne, posiadające instalację do obróbki biologicznej odpadów, w większości pracują w oparciu o technologię tlenową. Zaledwie kilka z nich wykorzystuje proces fermentacji metanowej w celu ustabilizowania frakcji odpadów ulegających biodegradacji.

Analizie porównawczej poddano dwa zakłady wyposażone w instalację mechaniczno-biologicznego przetwarzania odpadów komunalnych, tj.:

- Zakład Zagospodarowania Odpadów w Poświętnem;
- Zakład Zagospodarowania Odpadów w Trzebani.

W pracy porównane zostały rozwiązania technologiczne części biologicznej instalacji w oparciu, o które powyższe zakłady pracują. Przedstawione zostały także bilanse mas odpadów, które stanowiły materiał wsadowy do procesów biologicznych oraz które powstały w wyniku tych procesów. Na tej podstawie obliczono ubytek masy, tzw. straty procesowe, a wyniki porównano.

##### **4.1. Zakład Zagospodarowania Odpadów w Poświętnem**

Zakład Zagospodarowania Odpadów w miejscowości Poświętne stanowi instalację regionalną do obsługi płockiego regionu gospodarki odpadami. Zakład posiada instalację do mechaniczno-biologicznego przetwarzania. Część mechaniczna zlokalizowana jest w hali sortowni i tworzą ją m. in. kabiny sortownicze, separatory (optyczne, metali żelaznych), system przenośników oraz sito trzyfrakcyjne (rozdział na frakcje: 0-80 mm, 80-300 mm, >300 mm), na którym wydzielana frakcja podsitowa (0-80 mm), stanowiąca docelowo materiał wsadowy do części biologicznej.

Obróbka biologiczna frakcji podsitowej pochodzącej ze strumienia odpadów zmieszanych oraz doczyszczania frakcji surowcowych zebranych selektywnie przeprowadzana jest dwuetapowo:

- faza intensywna procesu w komorach kompostowniczych w systemie BIODEGMA;
- dojrzewanie na otwartym placu.

Część biologiczna odbywa się w sześciu bioreaktorach. Każdy z nich posiada uchylne zadaszenie, a także wrota. Od wewnątrz zarówno wrota, jak i skrzydła dachu, pokryte są membraną półprzepuszczalną. Zadaniem membrany jest zabezpieczenie przed przedostaniem się do atmosfery nieoczyszczonego powietrza powstającego podczas procesu obróbki biologicznej odpadów. Wszystkie moduły wyposażone są także w system napowietrzania (jeden wentylator na jeden moduł), system ujmowania odcieków oraz zraszania w przypadku spadku wilgotności materiału. Odebrane odcieki oraz woda poprocesowa kierowane są do wewnętrzznego

systemu kanalizacji, a następnie poddawane są oczyszczaniu w oczyszczalni ścieków znajdującej się na terenie Zakładu. Cały proces jest monitorowany z pomieszczenia sterowni. Odpady pozostają w komorach przez okres co najmniej dwóch tygodni aż do uzyskania parametru  $AT_4$  (aktywność oddychania) poniżej 20 mg  $O_2/g$  suchej masy. Po osiągnięciu wymaganej wartości parametru, stabilizat (w przypadku przetwarzania frakcji podsitowej o wielkości 0-80 mm) bądź kompost (w przypadku odpadów ulegających biodegradacji zebranych selektywnie) przewożony jest na plac dojrzwania, gdzie zostaje przez okres co najmniej 6 tygodni do uzyskania parametru  $AT_4$  poniżej 10 mg  $O_2/g$  suchej masy. W trakcie tego czasu materiał jest przrzucany w celu zabezpieczenia przed powstawaniem stref beztlenowych (stref stagnacji). Do końca 2015 r. dojrzały stabilizat przesiewany był następnie na sicie mobilnym o wielkości oczek 20 mm. Frakcja powyżej 20 mm kierowana była na składowisko w celu dalszego zagospodarowania, a frakcja o uziarnieniu poniżej 20 mm wykorzystywana była do rekultywacji zamkniętej kwatery składowiska należącego do Przedsiębiorstwa Gospodarki Komunalnej w Płońsku.

W tabeli nr 1 przedstawiony został bilans odpadów poddanych obróbce biologicznej w 2014 r. oraz odpadów, które powstały w wyniku procesu [9, 10].

Tabela 1. Bilans odpadów części biologicznej Zakładu Zagospodarowania Odpadów w Poświętnem za 2014 r.

Przed procesem			Po procesie		
Rodzaj i kod odpadów	Masa [Mg]	Udział [%]	Rodzaj i kod odpadów	Masa [Mg]	Udział [%]
Frakcja 0-80 mm (podsitowa) ex 19 12 12	27 942,6	98,3	Frakcja 0-20 mm 19 05 03	13 870,8	48,8
Odpady ulegające biodegradacji 20 02 01	482,4	1,7	Frakcja powyżej 20 mm	5 897,1	20,7

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [9]

Z powyższego bilansu masowego wynika, iż w 2014 r. tlenowemu biologicznemu przetwarzaniu poddane zostały głównie odpady pochodzące ze strumienia odpadów zmieszanych. Odpady ulegające biodegradacji we wskazanym okresie stanowiły jedynie ok. 2%. Znaczenie dla takiego rozkładu procentowego dla poszczególnych frakcji ma system zbiórki odpadów w rejonie obsługi. W analizowanym okresie obie frakcje odpadów przetwarzane były łącznie, a produktem powstałym w wyniku tego procesu był stabilizat, przesiewany w dalszej kolejności na sicie mobilnym. Z tabeli nr 1 wynika również, iż na skutek przeprowadzonego procesu uzyskano ubytek masy odpadów na poziomie równym 30,5%.

#### 4.2. Zakład Zagospodarowania Odpadów w Trzebani

Zakład Zagospodarowania Odpadów w Trzebani posiada status instalacji regionalnej dla dwudziestu gmin województwa wielkopolskiego. Zakład ten, tak jak w przypadku Zakładu w Poświętnem, wyposażony jest w instalację mechaniczno-biologicznego przetwarzania odpadów komunalnych. Na część mechaniczną składają się m. in. takie urządzenia jak sito trzyfrakcyjne (rozdział na frakcje: 0-40 mm, 40-80 mm, >80 mm), separatory (metali żelaznych oraz balistyczny), kabina sortownicza i system przenośników. Frakcja o granulacji 40-80 mm (frakcja średnia, biofrakcja)

po odpowiednim przygotowaniu kierowana jest do beztlenowego procesu biologicznego, tj. do fermentacji metanowej suchej termofilowej.

Biologiczne przetwarzanie biofrakcji przebiega dwuetapowo:

- faza intensywna procesu prowadzona w instalacji przeznaczonej do fermentacji biofrakcji w technologii Dranco przez okres trzech tygodni;
- dojrzewanie pofermentatu w przerzucanych prymach na placu dojrzewania przez okres trzech tygodni.

Hala technologiczna przeznaczona do procesu fermentacji podzielona jest na dwie części: część buforową służącą gromadzeniu materiału wsadowego oraz część technologiczną, w której zlokalizowana jest instalacja do fermentacji biofrakcji oraz do odwadniania osadów poprocesowych. Część pofermentatu w postaci zawiesiny wykorzystuje się jako materiał zaszczepiający świeży materiał wsadowy. Nadmiar zaś transportowany jest do układu odwadniania osadów, a następnie na plac dojrzewania.

Biogaz, który powstaje w trakcie procesu zbiera się ponad fermentowaną frakcją, skąd jest ujmowany, a następnie przenoszony do instalacji oczyszczania oraz wykorzystania biogazu.

W tabeli nr 2 przedstawiony została bilans masowy odpadów w części biologicznej za 2014 r.

Tabela 2. Bilans odpadów części biologicznej Zakładu Zagospodarowania Odpadów w Trzebani za 2014 r.

Przed procesem			Po procesie		
Rodzaj i kod odpadów	Masa [Mg]	Udział [%]	Rodzaj i kod odpadów	Masa [Mg]	Udział [%]
Frakcja podsitowa 19 12 12	22 435,27	100	Frakcja 0-20 mm 19 05 03	18 620,0	86,9

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [9]

Z zamieszczonego bilansu wynika, iż materiał wsadowy do procesu fermentacji stanowiła tylko frakcja wydzielona ze strumienia odpadów zmieszanych. W wyniku przeprowadzonego procesu uzyskano ubytek masy na poziomie równym 13,1%. Warto zaznaczyć, że produktem fermentacji, oprócz wskazanego stabilizatu, jest również biogaz powstający w ilości 90-100 Nm<sup>3</sup>/Mg odpadów przy podanych warunkach procesowych, z którego następnie produkowana jest energia elektryczna (odnawialne źródło energii).

## 5. Podsumowanie i wnioski

Odpady ulegające biodegradacji zarówno te zebrane selektywnie jak również pochodzące ze strumienia odpadów zmieszanych mogą zostać poddane procesom biologicznym w warunkach tlenowych (kompostowanie, stabilizacja) bądź beztlenowych (fermentacja metanowa). Efektywność procesów jest ściśle zależna m. in. od rodzaju wsadu, który związany jest z systemem gromadzenia odpadów w danym rejonie obsługi. We wskazanych zakładach odpady ulegające biodegradacji zebrane selektywnie występowały w znikomej ilości lub wcale.

Ubytek masy odnotowany został w 2014 r. na poziomie ok. 30% w Zakładzie Zagospodarowania Odpadów w Poświętnem oraz ok. 13% w Zakładzie Zagospodarowania Odpadów w Trzebani. Dane literaturowe [5] wskazują na straty procesowe w wyniku procesów biologicznych na poziomie równym ok. 30%. Jest to jednak wartość uśredniona, której wielkość jest związana z rzeczywistą ilością związków organicznych występujących w materiale wsadowym. Większy ubytek masy w Zakładzie w Poświętnem może być w pewnym stopniu związany z poddaniem obróbce biologicznej również odpadów ulegających biodegradacji selektywnie zebranych (ok. 2% wszystkich odpadów skierowanych do części biologicznej).

Warto zauważyć, iż w przypadku metody beztlenowej w wyniku procesu biologicznego uzyskujemy dodatkową korzyść w postaci biogazu, który stanowi źródło energii i tak też jest wykorzystywany w Zakładzie w Trzebani.

Bardzo ważne z punktu widzenia biologicznego przetwarzania odpadów komunalnych jest Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 29 grudnia 2016 r. w sprawie szczegółowego sposobu zbierania wybranych frakcji odpadów [11] wprowadzające obowiązek selektywnego zbierania frakcji odpadów ulegających biodegradacji. Dalsze badania powinny być prowadzone pod kątem realizacji tego Rozporządzenia oraz jego wpływu na efektywność procesów biologicznych, jakim poddawane są odpady.

## Literatura

1. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/98/WE z dnia 19 listopada 2008 r. w sprawie odpadów oraz uchylającej niektóre dyrektywy (Dz. Urz. UE L 312 z 22.11.2008, str. 3, z późn. zm.).
2. Ustawa z dnia 14 grudnia 2012 r. o odpadach (t. j. Dz. U. z 2018, poz. 21).
3. Uchwała Nr 88 Rady Ministrów z dnia 1 lipca 2016 r. w sprawie Krajowego planu gospodarki odpadami 2022 (M.P. Nr 88, poz. 784).
4. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 25 maja 2012 r. w sprawie poziomów ograniczenia masy odpadów komunalnych ulegających biodegradacji przekazywanych do składowania oraz sposobu obliczania poziomu ograniczania masy tych odpadów (Dz. U z 2012 r., poz. 676).
5. Jędrzak A., *Biologiczne przetwarzanie odpadów*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
6. Skalmowski A., *Unieszkodliwianie odpadów*, [w:] Skalmowski A. (red.), *Poradnik gospodarowania odpadami*, Wydawnictwo Verlag Dashofer, Warszawa 2010.
7. Bilitewski B., Härdtle G, Marek K., *Poradnik gospodarki odpadami*, Wydawnictwo Seidel-Przywecki, Warszawa 2003.
8. Podkówka W, Kowalczyk-Juško A., *Przemiany biochemiczne w procesie powstawania biogazu rolniczego*, [w:] Podkówka W. (red) *Biogaz rolniczy odnawialne źródło energii. Teoria, praktyczne zastosowanie*, Powszechnie Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 2012.
9. Jędrzak A., den Boer Emilia, *Raport końcowy III etapu ekspertyzy mającej na celu przeprowadzenie badań odpadów w 20 instalacjach do mechaniczno-biologicznego przetwarzania odpadów*, Zielona Góra 2015.
10. Wiśniewska M, Lelicińska-Serafin K., *Biologiczne przetwarzanie odpadów komunalnych w Przedsiębiorstwie Gospodarki Komunalnej w Płońsku na przykładzie odpadów odebranych z obszaru gminy Bodzanów*, [w:] Skoczko I. i in. (red.) vol. 35 *EKOENERGETYKA, Inżynieria Środowiska – Młodym Okiem*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej, Białystok, 2017.
11. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 29 grudnia 2016 r. w sprawie szczegółowego sposobu zbierania wybranych frakcji odpadów (Dz. U z 2016 r., poz. 19).



## **Biologiczne przetwarzanie odpadów komunalnych w warunkach tlenowych i beztlenowych**

### Streszczenie

Celem pracy jest porównanie dwóch metod przetwarzania odpadów ulegających biodegradacji, zarówno tych zbieranych selektywnie, jak również frakcji podsitowej pochodzącej ze strumienia odpadów zmieszanych. W pracy przedstawiono przykładowe rozwiązania instalacji na terenie Polski, w których elementem ciągu technologicznego jest proces fermentacji metanowej oraz tych, które bazują na procesie stabilizacji tlenowej. Na podstawie bilansu odpadów przetwarzanych w wybranych zakładach pokazano produkty poszczególnych procesów biologicznych, a także ubytek wyjściowej masy odpadów. Biologiczne przetwarzanie odpadów ma szczególne znaczenie dla wymogów Krajowego planu gospodarki odpadami 2022 (KPGO 2022), który zakłada m.in. zmniejszenie ilości odpadów ulegających biodegradacji przekazywanych do składowania oraz ogólnej ilości składowanych odpadów.

Słowa kluczowe: fermentacja, kompostowanie, odpady komunalne.

## **The biological treatment of municipal waste in aerobic and anaerobic conditions**

### Abstract

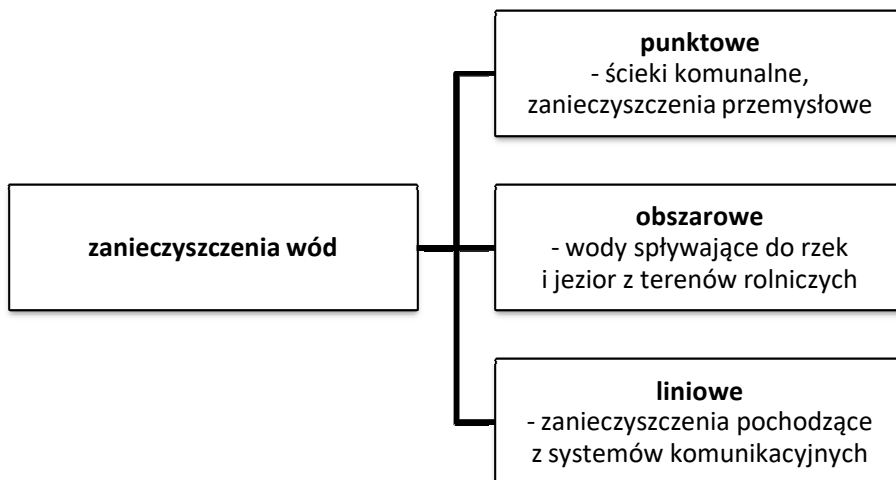
The work is the comparison of the two processing methods of biodegradable waste, both these collected separately, as well as fraction originating from the waste stream. At work, gives examples of arrangements of Poland, in which part of the technological process is a methane fermentation and those which are based on the stability which is the aerobic process. On the basis of the balance of waste processed in selected plants shown the products of the processes and the loss in weight. The biological waste treatment has got a particular importance for the requirement of National waste management plan 2022, which provide the reduction of biodegradable waste transferred to storage and the total quantities of stored waste.

Keywords: composting, fermentation, waste.

# Oczyszczanie ścieków przemysłowych w reaktorach typu SBR

## 1. Wprowadzenie

Wśród skutków działalności człowieka wyróżnia się m.in. zanieczyszczenia wód, które można klasyfikować np. ze względu na sposób ich powstawania zgodnie z rysunkiem 1.1.



Rysunek 1. Podział zanieczyszczeń wód według sposobu ich powstawania [1]

Odprowadzanie odpadów – zarówno stałych jak i płynnych do wód było dla człowieka bardzo wygodnym rozwiązaniem. Ścieki odprowadzane do rzeki rynsztokami ulegały rozcieńczeniu i samooczyszczeniu, natomiast rzeka w pewnej odległości w dół swego biegu od miejsca zrzutu zanieczyszczeń odzyskiwała właściwą jakość. Teraz jest to jednak niemożliwe, choćby z uwagi na fakt, że m.in. w związku z rozwojem przemysłu, stale dokonuje się syntezy nowych związków chemicznych, które trafiają do cyklu obiegu wody w przyrodzie i mogą niekorzystnie oddziaływać na środowisko, w tym również na zdrowie człowieka [1].

Ogólny rozwój przemysłu, czy też zmiany w profilu produkcji wiążą się ze zmianami w składzie ścieków. Coraz bardziej rygorystyczne wymagania co do jakości ścieków oczyszczonych, również skutkują koniecznością poszukiwania bardziej skutecznych metod oczyszczania powstającego medium. Co ważne w ostatnich latach nastąpił wyraźny postęp w technologii umożliwiającej redukcję

<sup>1</sup> sylwia.m.duda@gmail.com, SKN FOR&AGAINST, Katedra Zaopatrzenia w Wodę i Usuwania Ścieków, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Lubelska, www.pollub.pl.

<sup>2</sup> W.Cel@wis.pol.lublin.pl, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Lubelska, www.pollub.pl.

poziomu zanieczyszczeń ze ścieków bytowo-gospodarczych. Klasyczne procesami oczyszczania ścieków ze związków biogenych to amonifikacja, nitrifikacja, denitryfikacja dysymilacyjna. Jednak obecnie realizuje się wiele procesów alternatywnych (umożliwiających głównie usuwanie związków azotu): asymilacyjna redukcja azotanów, anaerobowe utlenianie amoniaku (ANAMMOX), tlenowa denitryfikacja, tlenowa demonifikacja, symultaniczna nitrifikacja i denitryfikacja [2-5]. Temat oczyszczania ścieków przemysłowych był przez długi okres niewystarczająco eksponowany. Obecnie jednak stanowi istotne zagadnienie zarówno w obrębie badań naukowych i prac rozwojowych jak i wdrożeń na skalę przemysłową.

Według danych GUS, w głównej mierze to wody chłodnicze nie wymagające oczyszczania klasyfikowane są jako ścieki przemysłowe. Jednak według danych gromadzonych w latach 1990-2015 ścieki wymagające oczyszczenia stanowią 25-30% ogólnej ilości ścieków przemysłowych. Co ważne, ogólny wzrost świadomości i dbałości o środowisko, a także coraz bardziej rygorystyczne wymagania stawiane jakości ścieków oczyszczonych przyczyniły się do wyraźnego wzrostu ilości ścieków poddawanych oczyszczaniu z podwyższonym usuwaniem biogenów, przy jednoczesnym spadku ilości ścieków nieoczyszczanych (według danych z 2015 roku, stanowiły one około 5% objętości ścieków przemysłowych wymagających oczyszczenia) [6]. Obecne wymagania wysokoefektywnego oczyszczania ścieków przy możliwie jak najniższych kosztach eksploatacyjnych, przyczyniły się do znacznej popularyzacji sekwencyjnych reaktorów porcjowych [7-9].

Reaktory typu SBR czyli sekwencyjne reaktory porcjowe (z ang. *Sequencing-Batch-Reactor*), służą często do oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. Urządzenia te pracują w systemie półprzepływowym, gdzie w jednym urządzeniu z pełnym wymieszaniem, cyklicznie następują kolejne fazy cyklu pracy reaktora [10-12].

Celem niniejszego rozdziału jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy z zakresu oczyszczania ścieków przemysłowych w sekwencyjnych reaktorach porcjowych.

## 2. Technologia reaktorów SBR

Pod koniec lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku w USA, został uruchomiony pierwszy reaktor typu SBR, a w 1970 r. Irvine wprowadził skrót SBR czyli Sequencing Batch Reactor. Jednak dopiero w 1982 r, w Stanach Zjednoczonych powstał pierwszy duży obiekt wykorzystujący takie reaktory. Tymczasem dopiero po analizie wyników wielu badań, w roku 2000 zdefiniowano klasyczne reaktor typu SBR w sensie hydraulicznym [13, 14]. Pierwsza polska wzmianka na temat sekwencyjnych reaktorów porcjowych pojawiła się w 1990 r., w czasopiśmie „Gaz, Woda i Technika Sanitarna” [14].

W sekwencyjnych reaktorach porcjowych możliwe jest prowadzenie procesów połączonego usuwania węgla, azotu i fosforu [11, 12, 15]. Analizowana literatura wskazuje, że efektywność oczyszczania ścieków w sekwencyjnych reaktorach porcjowych jest bardzo wysoka. Jest to szczególnie istotne w kontekście ciągle zaostrzanych wymogów usuwania związków biogenych ze ścieków [7, 17-19].

Oczyszczanie ścieków w opisywanych reaktorach odbywa się podczas cyklicznie prowadzonego procesu, w kolejnych fazach [10, 11, 16, 17]:

**FAZA I – NAPEŁNIANIE** – w urządzeniu znajduje się pewna ilość czynnika procesowego i doprowadzane są do niego ścieki surowe (nieoczyszczone). W trakcie tej fazy bakterie obecne w osadzie czynnym rozkładają łatwo przyswajalne substancje organiczne.

Jeśli w ściekach surowych występują duże stężenia substancji toksycznych stosuje się napełnianie z jednoczesnym napowietrzaniem. Jeśli natomiast w oczyszczanych ściekach występują azotany stosuje się napełnianie z równoległym mieszaniem (denitryfikacja zachodzi już na początku cyklu). Mieszanie w pierwszej fazie może też przyczynić się do uwalniania fosforanów [15, 20-21].

**FAZA II – MIESZANIE** – ścieki zostają wymieszane z osadem czynnym, za pomocą mieszadeł. Proces ten prowadzony jest w warunkach niedotleniono-beztlenowych, aby możliwa była denitryfikacja.

**FAZA III – NAPOWIETRZANIE** – proces ten jest realizowany przez dyfuzory, które napowietrzają mieszaninę znajdującą się w komorze reaktora. Zachodzi wtedy mineralizacja związków organicznych, nitryfikacja oraz biologiczna defosfatacja. Wewnątrz kłaczek osadu czynnego (strefy beztlenowe) może zachodzić również denitryfikacja.

**FAZA IV – SEDYMENTACJA** – następuje wtedy grawitacyjne opadanie zawiesin (oddzielenie osadu czynnego od oczyszczonych ścieków).

**FAZA V – DEKANTACJA** (faza V) – służy odprowadzeniu z układu sklarowanych ścieków oczyszczonych.

**FAZA VI – FAZA MARTWA** (faza oczekiwania) – w czasie trwania tej fazy usunięty zostaje z urządzenia osad nadmierny.

Według literatury [17, 22] czas trwania faz zależy głównie od rodzaju ścieku, natężenia ich przepływu, właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego, a także sposobu doprowadzenia i odprowadzenia ścieków. Harmonogram pracy reaktora (długość poszczególnych faz) ma duże znaczenie dla uzyskiwanym rezultatów oczyszczania ścieków. W praktyce najczęściej spotyka się cykle trwające 12 godzin [22].

Sekwencyjnych reaktory porcjowe nie wymagają stosowania osadników wstępnych i nigdy nie współpracują z osadnikami wtórnymi, ponieważ reaktory typu SBR pełnią równocześnie rolę komory osadu czynnego i osadnika [23-25]. Omawiane urządzenia nie wymagają stosowania urządzeń do recyrkulacji, jednak mogą występować wydzielone selektory [26-28].

Podsumowując, do podstawowych cech urządzeń tego typu zalicza się [14, 29]:

- cały proces prowadzony jest w jednym zbiorniku;
- oczyszczanie ścieków prowadzone jest zwykle metodą osadu czynnego;
- poziom ścieków zmienia się w trakcie cyklu pracy;
- poszczególne fazy następują w ustalonej kolejności, z możliwością regulowania czasu ich trwania;
- oczyszczone ścieki są odprowadzane z układu, a osad nadmierny zostaje usunięty.

### 3. Ścieki przemysłowe

Ogólnie, ścieki przemysłowe ulegają zmieszaniu ze ściekami bytowo-gospodarczymi w systemach kanalizacyjnych i mieszanina ta, kierowana jest dalej do obiektów technologicznych służących oczyszczaniu ścieków. Jeżeli ścieki przemysłowe stanowią maksymalnie 20% ogólnej ilości, nazywamy je komunalnymi. Gdy mieszanina zawiera 20-50% ścieków przemysłowych mowa o ściekach mieszanych, natomiast ścieki przemysłowe kwalifikujemy jeśli ponad 50% ścieków pochodzi właśnie z przemysłu [30]. W rzeczywistości także wiele zakładów oczyszcza lub podczyszcza ścieki przemysłowe na własnym terenie.

Według niemieckich wytycznych ATV 118 ilość ścieków z zakładów nisko wodochłonnych wyznacza się 0,2-0,5 l/s, ha, natomiast z przemysłu wysoko wodochłonnego 0,5-1,0 l/s, są to jednak wartości orientacyjne. Ze względu na duże zróżnicowanie zakładów przemysłowych nawet o podobnym profilu produkcji (ciągły rozwój i modyfikacje technologii), ilość ścieków przemysłowych powinno ustalać się indywidualnie, uwzględniając czynniki tj. [31]:

- przewidziany rodzaj produkcji;
- wielkość zakładu przemysłowego;
- wodochłonność planowanych procesów produkcyjnych.

Poza zmiennością wielkości odpływu ścieków z zakładów, utrudnienie dla procesu oczyszczania ścieków przemysłowych stanowi także problem szczegółowego rozpoznania jakości tego rodzaju medium w zależności od gałęzi przemysłu, a także ich wysokie obciążenie zanieczyszczeniami (występowanie np. związków toksycznych) [31, 32].

#### 3.1. Oczyszczanie ścieków przemysłowych w sekwencyjnych reaktorach porcjowych

Nierównomierny skład jakościowy i ilościowy ścieków przemysłowych przemasza za stosowaniem sekwencyjnych reaktorów porcjowych do ich oczyszczania. Ogromną zaletą reaktorów SBR jest duża elastyczność ich pracy i dobre efekty oczyszczania medium.

Analizowana literatura wskazuje dodatkowo, że mikroorganizmy w reaktorze porcjowym w porównaniu do klasycznej metodzie osadu czynnego (układy przepływowe) szybciej się adaptują oraz charakteryzują się większą odpornością na niekorzystne warunki środowiska – co również jest zjawiskiem korzystnym w technologii oczyszczania ścieków przemysłowych.

##### 3.1.1. Ścieki z przemysłu włókienniczego

W niniejszej części rozdziału omówione zostaną koncentraty ponanofiltracyjne ścieków włókienniczych w kontekście ich oczyszczania w reaktorach typu SBR. Ten rodzaj medium charakteryzuje się obecnością barwy, jest obciążony ładunkiem zanieczyszczeń zarówno organicznych jak i nieorganicznych, a ponadto charakteryzuje się znaczną zmiennością składu w czasie [33-36].

Podczas oczyszczania ścieków z przemysłu tekstylnego, szczególnie problematyczna okazuje się biodegradacja barwników azowych. Proces ich usuwania wymaga utrzymania najpierw warunków beztlenowych, umożliwiających rozpad wiązań

azowych, a następnie warunków tlenowych celem mineralizacji amin powstających podczas rozpadu wiązań azowych. Reaktory typu SBR umożliwiają utrzymanie procesu w wyżej opisanych warunkach [35, 36].

Zespół badawczy Paździor i in. [35] prowadził badania w zakresie zastosowani reaktorów SBR jedno- i dwustopniowych do oczyszczania ścieków przemysłowych. Przeprowadzone badania dowiodły, że lepsze efekty biodegradacji zanieczyszczeń można uzyskać stosując dwustopniowy układ reaktorów z rozdzielonym osadem niż układ jednostopniowy. Uzyskano podobny stopień redukcji barwy w obu układach, jednak pojedynczy reaktor typu SBR nie zapewniał pełnej mineralizacji amin. Wartości ChZT w odpływie z reaktora SBR z układu beztlenowo-tlenowego spełniały wymagania, natomiast w układzie jednostopniowym wymagania dla odprowadzania ścieków do wód powierzchniowych nie były spełniane.

Z kolei zespół prowadzący badania w 2010 r. proponował oczyszczanie tego rodzaju ścieków w reaktorach typu SBR w 20 godzinnym cyklu pracy w połączeniu z nanofiltracją (NF). Reaktor zasilany był ściekami syntetycznymi odpowiadającymi składem ściekom włókienniczym lub retentatem NF zmieszany z ściekami syntetycznymi. Jakość procesu oczyszczania oceniano na podstawie efektywności usuwania ChZT i barwy. Stwierdzono, że proces przebiegał lepiej przy zasilaniu reaktora tylko ściekami syntetycznymi (nawet 90% usunięcia barwy) [36].

### 3.1.2. Ścieki z przemysłu papierniczego

Ścieki z przemysłu papierniczego ogólnie scharakteryzować można jako medium wysoko obciążone ładunkiem związków organicznych, zawierające substancje trudno rozkładalne i toksyczne [32].

Jako ścieki z gałęzi przemysłu papierniczego rozważono odpływ z produkcji płyt pilśniowych. Analizowane prace omawiają współoczyszczanie ścieków przemysłowych i syntetycznych, odpowiadających składem ściekom bytowo-gospodarczym [37-38]. Stwierdzono, że zwiększanie procentowego udziału ścieków przemysłowych w mieszaniu wpływa na obniżenie efektywności procesu oczyszczania. Również podwyższenie wartości obciążenia reaktorów, czy też obniżenie czasu zatrzymania powodowało spadek stopnia usunięcia zanieczyszczeń organicznych [38]. Analiza wskaźników zanieczyszczeń wskazywała na pracę układów jako nisko obciążonych. Przeprowadzone badania wskazują także, że istnieje możliwość zastosowania pola ultradźwiękowego do wspomaganie procesu współoczyszczania ścieków z produkcji płyt pilśniowych. Na efektywność oczyszczania miały wpływ parametry pola ultradźwiękowego. Korzystniejsze było kondycjonowanie ścieków przemysłowych w polu ultradźwiękowym o amplitudzie 22,4  $\mu\text{m}$  (zamiast 48,8  $\mu\text{m}$ ) – odnotowano poprawę jakości ścieków oczyszczonych oraz obniżenie wartości wskaźnika ChZT ścieków surowych [37].

### 3.1.3. Ścieki mleczarskie

Obecnie ścieki mleczarskie stanowią głównie wody z mycia i płukania aparatury, urządzeń do transportu mleka np. cysterny i rurociągów do transportu mleka na terenie zakładów mleczarskich. Zanieczyszczenie stanowi w tym przypadku mleko oraz środki czyszczące. W ostatnich latach, nie stosuje się już kwasu azotowego oraz ługu sodowego jako środki myjące. Zastąpiono je skuteczniejszymi detergentami syntetycznymi. Mechaniczny stopień oczyszczania tego rodzaju ścieków powinno być nastawione na usuwanie tłuszczów, a nie zawiesin [32].

Stężenia zanieczyszczeń w ściekach mleczarskich zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zakres stężeń zanieczyszczeń w ściekach mleczarskich

Zanieczyszczenie	Jednostka	Wartość
BZT <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> /l	500-2000
ChZT	mg O <sub>2</sub> /l	700-2800
Azot ogólny	g/m <sup>3</sup>	30-150
Fosfor Ogólny	g/m <sup>3</sup>	20-100
pH	-	9-10,5

Źródło: [32]

Zgromadzona literatura omawia głównie współczyszczanie ścieków mleczarskich z odciekami składowiskowymi w reaktorach membranowych MSBR [39]. Zauważono, że wprowadzenie ścieków mleczarskich wpłynęło na poprawę skuteczności usuwania azotu azotanowego z mieszaniny. Problematyczne okazało się usuwanie fosforu do akceptowalnego poziomu. Z kolei analiza mikroskopowa osadu czynnego wskazywała na szybki przyrost orzęsków i wrotków. Regularny kształt kłaczków, ich średnia wielkość i luźna struktura świadczyły o pracy układu w średnim obciążeniu [40].

Kolejna analizowana praca, omawiała wpływ stałego pola magnetycznego (SPM) na proces usuwania związków biogenych ze ścieków mleczarskich w reaktorach SBR. Badania nad zastosowaniem SPM dowiodły, że sprzyjało ono procesowi usuwania związków biogenych, choć znaczenie tego czynnika w większości wariantów nie było istotne. Natomiast podobnie jak w przytaczanych wcześniej przykładach (ścieki włókiennicze i z przemysłu papierniczego), istotny wpływ na pracę reaktora ma obciążenie ładunkiem związków organicznych [41].

### 3.1.4. Modyfikacje cyklu pracy bioreaktorów podczas oczyszczania ścieków przemysłowych

Jak wcześniej wspomniano, podczas oczyszczania ścieków mleczarskich i odcieków składowiskowych, trudne było zmniejszenie stężenia fosforu [39, 40]. Podjęto więc rozważania, czy zmiana czasu trwania poszczególnych faz w cyklu pracy reaktora SBR wpłynie na poprawę skuteczności usuwania fosforu fosforanowego i innych zanieczyszczeń normowanych przez Rozporządzenie Ministra Środowiska. Zauważono, że modyfikacje cyklu pracy reaktora MSBR nie wpłynęły na obniżenie stężenia związków organicznych, azotu amonowego i azotanowego w ściekach oczyszczonych. Natomiast efektywność usuwania azotu całkowitego i fosforu fosforanowego wzrosła [42].

## 4. Podsumowanie

Zgodnie z tematem niniejszej pracy stwierdzono, że sekwencyjne reaktory porcjowe znalazły zastosowanie w oczyszczaniu ścieków przemysłowych. Omówiono przykłady z przemysłu włókienniczego, mleczarskiego, papierniczego. Badania prowadzono na wielu płaszczyznach np. współczyszczanie ścieków mleczarskich z odciekami ze składowisk, wpływ stałego pola magnetycznego i ultradźwiękowego na proces oczyszczania, stosowanie reaktorów jedno- i dwustopniowych, a także rozważano modyfikacje cyklu pracy reaktorów [32-37].

Reaktory SBR znalazły szerokie zastosowanie w technologii oczyszczania ścieków przemysłowych, głównie dzięki możliwości dostosowania parametrów procesowych do zmiennego składu ilościowego i jakościowego oczyszczanego medium oraz

możliwości symultanicznego usuwania związków biogenych i utleniania substancji organicznych [36].

Czynnikami mającym decydujący wpływ na efektywność oczyszczania ścieków było obciążenie reaktorów. Najczęściej długość całego cyklu pracy reaktora wynosiła 12 godzin (2 cykle w ciągu doby).

## Literatura

1. Kundzewicz Z. W., Zalewski M., Kędziora A., Pierzgalski E., *Zagrożenia związane z wodą*, Nauka, 4/2010, s. 87-96.
2. Matusiewicz A., *Parametry warunkujące proces symultanicznej nitryfikacji/denitryfikacji SND w układach oczyszczania ścieków*, Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN, 12/2002, s. 305-317.
3. Podedworna J., *Zintegrowane usuwanie azotu i fosforu w reaktorze SBR z długotrwałym dawkowaniem ścieków poprzez selektor*, Prace Naukowe Politechniki Warszawskiej z. 41, Warszawa 2002.
4. Szewczyk K. W., *Biologiczne metody usuwania związków azotu ze ścieków*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2005.
5. Krzanowski S., Wałęga A., *Wpływ właściwości fizykochemicznych ścieków z przemysłu cukierniczego na aktywność osadu czynnego i efektywność usuwania związków azotu*, Infrastruktura i Ekologia terenów Wiejskich, PAN, 1/2007, s. 163-178.
6. Główny Urząd Statystyczny, *Ochrona środowiska 2016*, Informacje i opracowania statystyczne, Warszawa 2016.
7. Piaskowski K., *Wpływ parametrów procesowych na usuwanie związków biogenych w laboratoryjnych reaktorze typu SBR*, Rocznik Ochrony Środowiska, 5/2003, s. 221-237.
8. Al.-Rekabi W. S., Qiang H., Qiang W. W., *Review on sequencing batch reactors*, Pakistan Jour-nal of Nutrition 2007, 6, s. 11-19.
9. Grosser A., Kamizela T., Neczaj E., *Oczyszczanie ścieków z produkcji płyt pilśniowych wspomagane polem ultradźwiękowym w reaktorze SBR*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, t. 12 nr 4/2009, s. 295-305.
10. Materiały pomocnicze ATV-M 210 P, *Sekwencyjne reaktory porcjowe-SBR*, Wydawnictwo Seidel-Przywecki, Warszawa 1997.
11. Bever J., Stein A., Teichmann H., *Zaawansowane metody oczyszczania ścieków*, Oficyna Wydawnicza Projprzem-EKO, Bydgoszcz 1997.
12. Montusiewicz A., Łagód G., Piotrowicz A., pod red. Pawłowskiego L., *Modelowanie systemów oczyszczania ścieków*, Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Lublin 2010.
13. Gańczarczyk J., *Oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego*, Arkady, Warszawa 1969.
14. Styka W., Banaś J., *Rozwój technologii SBR w ostatnim 20-leciu*, 363-390, w. I Kongres Inżynierii Środowiska, Referaty problemowe, Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN, vol. 12. Lublin 2002.
15. Miksch K., Sikora J., *Biotechnologia ścieków*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010.
16. Dymaczewski Z., Oleszkiewicz J. A., Sozański M. M., *Poradnik eksploatatora oczyszczalni ścieków*, Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział Wielkopolski, Poznań 2011.
17. Jaromin-Gleń K., Duda S., Dobrowolska A., *Laboratoryjny SBR jako źródło gazów cieplarnianych*, Współczesne Zagadnienia Inżynierii Środowiska, Wydawnictwo Naukowe Tygiel Sp. z o.o., Lublin 2017.
18. Masłoń A., *Zastosowanie oczyszczalni ścieków SBR w aspekcie poprawy gospodarki ściekowej w regionach turystycznych*, Woda i surowce odnawialne a ich oddziaływanie na środowisko naturalne., 2011 s. 275-298.



19. Bartkowska I., Klaus W., *Analiza skuteczności działania oczyszczalni ścieków pracujących w systemie SBR*, *Ekonomia i Środowisko*, 4 (2013), s. 107-117.
20. Palis J. C., Irvine R. L., *Nitrogen removal in a low loaded single tank SBR*, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 1985.
21. Okada M., Sudo R., *Performance of sequencing batch reactor activated sludge processes for simultaneous removal of nitrogen, phosphorus and BOD as applied to small community sewage treatment*, *Wat. Sci. Technol.*, 1986.
22. Klimiuk E., Łebkowska M., *Biotechnologia w ochronie środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
23. Dennis R. W., Irvine R. L., *Effect of fill: react ratio on sequencing batch biological reactors*, *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 1979.
24. Miłsch K., Czerna B., Grabińska-Sota E., Kalka J., Surmacz-Górska J., *Biotechnologia ścieków*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2000.
25. Janosz-Rajczyk M., *Badania wybranych procesów oczyszczania ścieków*, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2008.
26. Heidrich Z., Witkowski A., *Urządzenia do oczyszczania ścieków projektowanie, przykłady obliczeń*, Wydawnictwo „Seidel-Przywecki” Sp. z o.o., Warszawa 2005.
27. Mańczak M., 2004, *Podział reaktorów okresowego działania - SBR*, *Zeszyty Komunalne* 7 (18), s. 35-38.
28. Masłoń A., Tomaszek J.A., 2008, *Innowacyjne rozwiązania sekwencyjnych reaktorów porcjowych stosowane w oczyszczaniu ścieków*, *Inżynieria i Ochrona Środowiska* t. 11, nr 4, s. 431-453.
29. Podedworna J., 2004, *Przegląd i ocena stanu badań nad oczyszczaniem ścieków w sekwencyjnych reaktorach porcjowych*, *Inżynieria i Ochrona Środowiska* t.7, nr 2, s. 227-247.
30. Krzywy E., Iżewska A., *Gospodarka ściekami i osadami ściekowymi*, Akademia Rolnicza w Szczecinie, Szczecin 2004.
31. Królikowska J., Królikowski A., Żaba T., *Kanalizacja – podstawy projektowania, wykonawstwa i eksploatacji*, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki, Kraków 2015.
32. Bartkiewicz B., Umiejewska K., *Oczyszczanie ścieków przemysłowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010.
33. Li H.-S., Zhou S.-Q., Sun Y.-B., Feng P., Li J.-D., 2009, *Advanced treatment of landfill leachate by a new combination process in a full-scale plant*, *Journal of Hazardous Material*, 172, s. 408-415.
34. Neczaj E., Okoniewska E., Kacprzak M., 2005, *Treatment of landfill leachate by sequencing batch reactor*, *Desalination*, 185, s. 357-362.
35. Paździor K., Klepacz-Smółka A., Ledakowicz S., Sójka-Ledakowicz J., Żyła R., 2012, *Porównanie efektów zastosowania jedni- i dwustopniowych reaktorów typu SBR do biodegradacji wysoko obciążonych ścieków*, *Inż. Ap. Chem.*, 51/4, s. 169-170.
36. Zuriaga-Agusti E., Iborra-Clar M. I., Mendoza-Roca J. A., Tancredi M., Alcaina-Miranda M. I., Iborra-Clar A., 2010, *Sequencing batch reactor technology coupled with nanofiltration for textile wastewater reclamation*, *Chemical Engineering Journal*, 161, s. 122-128.
37. Grosser A., Kamizela T., Neczaj E., 2009, *Oczyszczanie ścieków z produkcji płyt pilśniowych wspomagane polem ultradźwiękowym w reaktorze SBR*, *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, t. 12 nr 4, s. 295-305.
38. Kamizela T., 2011, *Współoczyszczanie ścieków z produkcji płyt pilśniowych w reaktorach SBR*, *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, t. 14 nr 2, s. 157-166.
39. Świerczyńska A., Bohdziewicz J., 2014, *Wpływ ścieków mleczarskich na efektywność oczyszczania odcieków w bioreaktorze membranowym*, *Proceeding of ECOpole*, 8 (2), s. 619-625.

40. Bohdziewicz J., Świerczyńska A., 2012, *Ocena efektywności współocyszczania odcieków ze składowiska odpadów komunalnych ze ściekami mleczarskimi w sekwencyjnym bioreaktorze membranowym*, Proceeding of ECOpole, 6 (2), s. 689-694.
41. Zieliński M., Hajduk A., Dębowski M., 2017, *Wpływ stałego pola magnetycznego na proces usuwania związków biogenych ze ścieków mleczarskich w reaktorze typu SBR*, Inżynieria Ekologiczna, 18/4, s. 7-12.
42. Świerczyńska A., Bohdziewicz J., 2015, *Modyfikacja cyklu pracy sekwencyjnego bioreaktora membranowego podczas oczyszczania ścieków przemysłowych*, Proceeding of ECOpole, 9 (1), s. 333-338.

## Oczyszczanie ścieków przemysłowych w reaktorach typu SBR

### Streszczenie

Rozwój przemysłu, a co za tym idzie zmiany w składzie ścieków oraz coraz bardziej rygorystyczne wymagania odnośnie jakości ścieków oczyszczonych, skutkują koniecznością poszukiwania bardziej skutecznych metod oczyszczania powstającego medium. Reaktory typu SBR (SBR z ang. *Sequencing – Batch – Reactor*) są to cyklicznie pracujące, porcjowe układy m.in. z osadem czynnym, służące do zintegrowanego usuwania związków biogenych z oczyszczanych ścieków. Urządzenie ta znalazły szerokie zastosowanie w procesach oczyszczania ścieków przemysłowych, głównie dzięki możliwości dostosowania cyklu pracy reaktora do zmiennego składu oczyszczanego medium.

Na podstawie aktualnej literatury krajowej i zagranicznej przeanalizowano problem dużej zmienności wielkości odpływu oraz jakości ścieków przemysłowych z różnych gałęzi produkcji, a także ich negatywne oddziaływanie na środowisko. Ponadto w opracowaniu przedstawiono wyniki prowadzonych na świecie badań z zakresu stosowania bioreaktorów do oczyszczania ścieków m.in. z przemysłu włókienniczego, mleczarskiego, papierniczego. Udokumentowano, że badania prowadzono na wielu płaszczyznach np. współocyszczanie ścieków mleczarskich z odciekami ze składowisk, wpływ stałego pola magnetycznego i ultradźwiękowego na proces oczyszczania, stosowanie reaktorów jedno- i dwustopniowych, a także liczne modyfikacje cyklu pracy reaktorów. Wykonanie pracy pozwoliło na wyciągnięcie wniosków zarówno dotyczących samej technologii omawianych bioreaktorów jak i co ważne oczyszczania ścieków przemysłowych.

Słowa kluczowe: reaktory SBR, sekwencyjne reaktory porcjowe, ścieki przemysłowe, oczyszczanie ścieków

## Purification of industrial wastewater in SBRs

### Abstract

The development of industry, and hence changes in the composition of sewage, and increasingly stringent requirements for the quality of treated wastewater, result in the need to search for more effective methods of cleaning the resulting medium. SBRs (Sequencing – Batch – Reactors) are cyclic working batch systems including, i.a. the activated sludge, used for integrated removal of nutrients from the treated wastewater. This device has been widely used in the industrial wastewater treatment processes, mainly due to the possibility of adapting the reactor's operating cycle to the variable composition of the treated medium.

On the basis of the current national and international literature, the problem of high variability of outflow and quality of industrial wastewater from various production branches as well as their negative impact on the environment, have been analyzed. In addition, the study presents the results of a global research on the use of bioreactors for wastewater treatment, including the wastewater from the textile, dairy and paper industries. It has been documented that the research was carried out on many levels, e.g. co-purification of dairy sewage with leachate from landfills, the influence of constant magnetic and ultrasonic field on the treatment process, use of one- and two-stage reactors, and numerous modifications of the reactor operation cycle. Conducting the work allowed to draw conclusions regarding both the technology of the discussed bioreactors and, what is important, the treatment of industrial wastewater.

Keywords: SBRs, sequential batch reactors, industrial wastewater, wastewater treatment

## Wpływ fotoaktywnych, związanych z powierzchnią, nanocząstek ZnO na wybrane szczepy bakterii

### 1. Wprowadzenie

Wraz z dynamicznym rozwojem nanotechnologii wzrasta światowa produkcja nanocząstek metali i tlenków metali, a nanomateriały znajdują coraz więcej zastosowań w przemyśle [1, 2]. Szczególnie wysoki potencjał aplikacyjny posiadają nanocząstki tlenków metali, odznaczające się silnym ładunkiem elektrycznym i wysoką fotoaktywnością [3, 4].

ZnO jest stosowany jako składnik kosmetyków, półprzewodników, detektorów UV i katalizatorów spalin [5]. Szeroki wachlarz zastosowań ZnO wynika z jego odporności na obróbkę termiczną i zdolności do absorpcji promieniowania UV [6-8]. Ważną cechą nanocząstek ZnO jest ich zdolność do hamowania wzrostu mikroorganizmów. Udowodniono, że nanoZnO wykazują działanie antybakteryjne nawet wobec przetrwalników [9, 10].

Siła bakteriostatycznego oddziaływania nanocząstek zależy od ich stężenia i powierzchni właściwej [11]. Dowiedziono, że nanocząstki ZnO, pod wpływem światła, indukują wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach bakterii zaburzając ich homeostazę. Wzrost stężenia RFT prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego powodującego destabilizację błony komórkowej, zahamowanie transportu komórkowego, denaturację białek i uszkodzenie DNA, a w konsekwencji śmierć komórki [4, 12, 13].

Antybakteryjne właściwości zawiesin nanocząstek są dobrze zbadane [4, 14-16], jednak ich zastosowanie jest ograniczone. O wiele większy potencjał aplikacyjny posiadają nanocząstki związane z powierzchnią w postaci powłok [17]. Powłoki antybakteryjne są szczególnie ważne w szpitalach, kuchniach, instalacjach sanitarnych i systemach wentylacyjnych. Dotychczas używane powłoki wytwarzane są głównie ze srebra i stopów miedzi [18], a ich działanie bakteriostatyczne opiera się o uwalnianie z nich jony metali [19]. Wytwarzanie takich powłok jest drogie, a ich właściwości, w wyniku oksydacji, z czasem słabną [20]. W związku z powyższym konieczne są badania mające na celu stworzenie tanich, wydajnych i trwałych powierzchni antybakteryjnych.

Celem badań było zbadanie wpływu związanych z powierzchnią, fotoaktywnych, nanocząstek ZnO na *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*.

---

<sup>1</sup> arkadiusz.gruca@up.krakow.pl, Instytut Biologii, Wydział Geograficzno-Biologiczny, Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN w Krakowie, www.biologia.up.krakow.pl.

<sup>2</sup> piotr.dulian@pk.edu.pl, Instytut Chemii i Technologii Nieorganicznej, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki <http://www.chemia.pk.edu.pl/>.

<sup>3</sup> pujaglar@cyfronet.pl, Instytut Inżynierii Materiałowej, Wydział Mechaniczny, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki, <http://mech.pk.edu.pl/>.

<sup>4</sup> magresta@wp.pl, Instytut Biologii, Wydział Geograficzno-Biologiczny, Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN w Krakowie, www.biologia.up.krakow.pl.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Materiały

Do eksperymentu użyto bakterii *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) i *Escherichia coli* (ATCC 35218). Szczepy pozyskano od firmy American Type Culture Collection (ATCC). Hodowle prowadzono w bulionie lizogennym firmy A&A Biotechnology zawierającym 0,5% ekstraktu drożdżowego, 1% tryptonu i 1% NaCl, pH bulionu skorygowano do 7,0.

Źródłem nanocząstek był octan cynku (II), pozyskany z firmy Chempur. Za powierzchnię pokrywaną warstwą nanoZnO posłużyły szklane szkiełka podstawowe wymiarach 25x45x1 mm.

W celu zbadania wpływu warstwy fotoaktywnych nanocząstek ZnO na bakterie przygotowano 120 szkiełek podstawowych. 60 szkiełek pokrytych nanowarstwą ZnO posłużyło za grupę doświadczalną, pozostałe 60 stanowiło grupę kontrolną.

### 2.2. Wytwarzanie nanowarstwy ZnO na podłożu szklanym metodą zol-żel

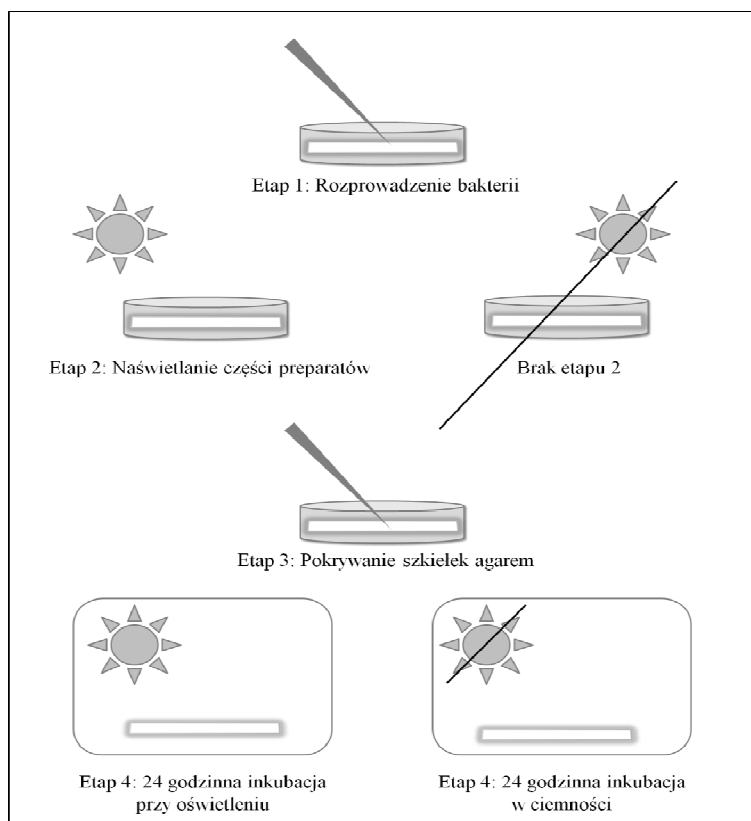
Cienkie warstwy tlenku cynku na podłożu szklanym wytworzono stosując metodę zol-żel wraz z techniką zanurzeniową. Jako prekursora jonów cynku podczas syntez użyto octan cynku(II), rozpuszczalnikiem był 2-metoksyetanol natomiast czynnikiem kompleksującym była etanoloamina. Proces wytwarzania cienkich warstw ZnO składał się z trzech etapów. W pierwszym wytworzono roztwór zolu o stężeniu jonów cynku wynoszącym  $0,25 \text{ mol/dm}^3$ , kolejnym etapem było naniesienie wytworzonego zolu na odpowiednio przygotowane podłoże szklane o wymiarach 25x45x1 mm stosując technikę *dip-coating*. Proces nakładania zolu polegał na zanurzeniu szklanej płytki w roztworze zolu na 30 sekund, w celu uzyskania równomiernego pokrycia, a następnie wynurzeniu jej z roztworu, w tempie (1 mm/s). W celu otrzymania cienkich warstw krystalicznego ZnO wytworzone filmy poddano dwuetapowej obróbce termicznej. Pierwszym etapem obróbki cieplnej było suszenie, w wyniku którego następowało odparowanie pozostałości rozpuszczalnika. Proces suszenia prowadzono przez 20 minut w temperaturze 200°C, w atmosferze powietrza. Kolejnym etapem obróbki cieplnej była kalcynacja, w wyniku której następował rozkład związków kompleksowych oraz tworzenie się krystalicznej fazy ZnO. Kalcynację prowadzono w temperaturze 500°C przez 60 minut. Uzyskana warstwa posiadała grubość około 40 nanometrów.

### 2.3. Badanie wpływu związanych z powierzchnią nanocząstek ZnO na bakterie

Dla badanych szczepów bakterii przeprowadzono doświadczenia w świetle i w ciemności, w 15 powtórzeniach (15 płytek doświadczalnych i 15 kontrolnych).

Na sterylne szkiełka podstawowe równomiernie naniesiono po 20µl 1000× rozcieńczonej zawiesiny bakterii z 24h hodowli bulionowych. Następnie szkiełka przeznaczone do doświadczeń w świetle przez 40 minut poddawano działaniu światła widzialnego o natężeniu  $50 \text{ µmol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ . Szkiełka przeznaczone do doświadczeń w ciemności trzymane były pod warstwą folii aluminiowej w celu zminimalizowania dostępu światła. Kolejny etap stanowiło nałożenie cienkiej ( $25 \text{ µl/cm}^2$ ) warstwy, schłodzonego do 45°C, agaru wzbogaconego. Tak przygotowane szkiełka inkubo-

wano przez 24h w temperaturze 37°C, w zależności od grupy, w ciemności lub w świetle widzialnym o natężeniu  $50 \mu\text{mol}\times\text{m}^{-2}\times\text{s}^{-1}$  (rys. 1). Po zakończeniu inkubacji zliczano kolonie bakteryjne wyrosłe na płytkach.



Rysunek 1. Schemat doświadczenia [opracowanie własne]

## 2.4. Analiza statystyczna

Dla zebranych danych wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe, sprawdzono także normalność ich rozkładu. Po potwierdzeniu normalności rozkładu, za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) sprawdzono różnice między badanymi grupami. Przeanalizowano także korelację między działaniem światła i nanocząstek ZnO.

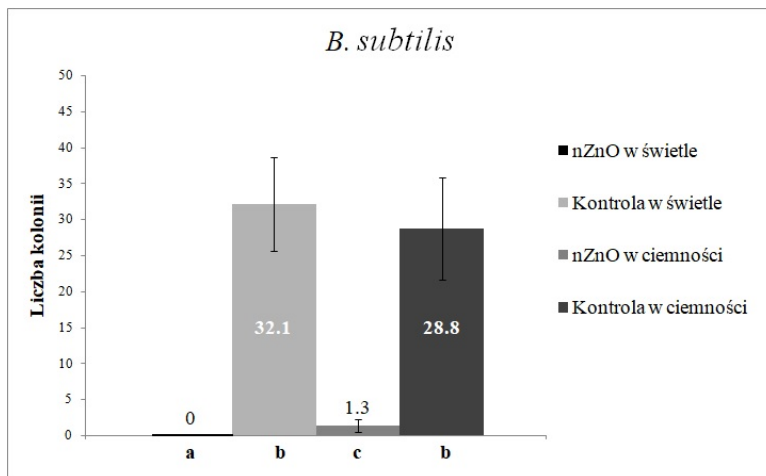
## 3. Analiza wyników

Użyta metoda badania antybakteryjnych właściwości nanocząstek ZnO związanych z powierzchnią była modyfikacją metody bezpośredniej. Zastosowanie  $1000\times$  rozcieńczenia hodowli użytych do badań miało na celu uzyskanie wzrostu bakterii w formie kolonii.

Zdj. 1. pokazuje wzrost *Bacillus subtilis* na szkiełkach podstawowych kontrolnych i pokrytych warstwą nanoZnO inkubowanych w świetle i w ciemności. Wzrost

bakterii został wyraźnie zahamowany w obu grupach doświadczalnych, natomiast między grupami kontrolnymi nie zaobserwowano istotnych różnic (wyk. 1).

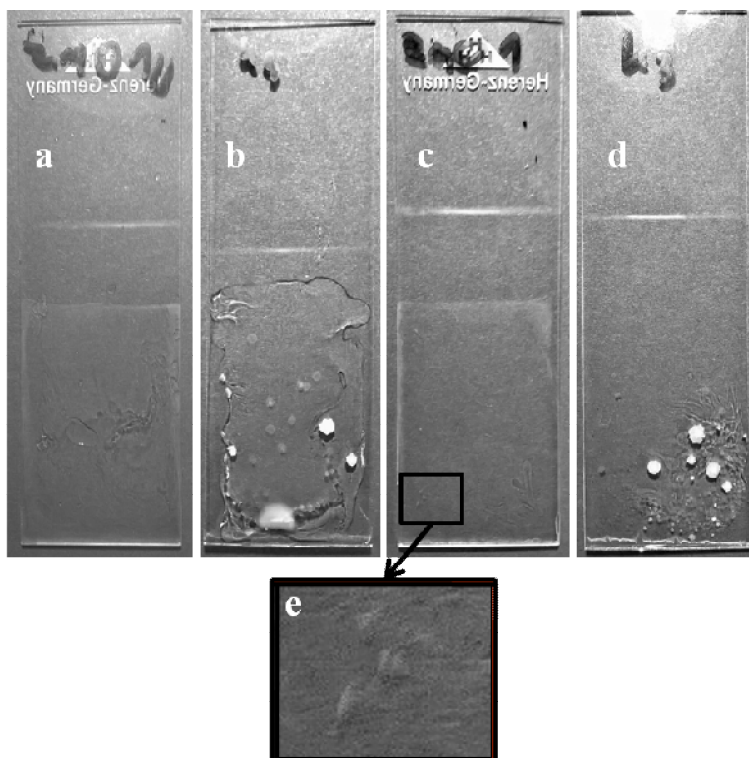
Ogólna liczba kolonii *B. subtilis*, na płytkach pokrytych nanoZnO inkubowanych w świetle, wyniosła 0. Świadczy to o całkowitym zahamowaniu przez nanocząstki ZnO wzbudzone światłem wzrostu bakterii. Na szkiełkach z warstwą nanoZnO inkubowanych w ciemności średnia liczba kolonii *B. subtilis* wynosiła 1,3. Wynik ten pokazuje spadek bakteriobójczych właściwości nanoZnO w ciemności. Przeprowadzona analiza statystyczna potwierdziła wysoce istotny dodatni wpływ światła na antybakteryjne właściwości związanych z powierzchnią nanocząstek ZnO wobec *B. subtilis*.



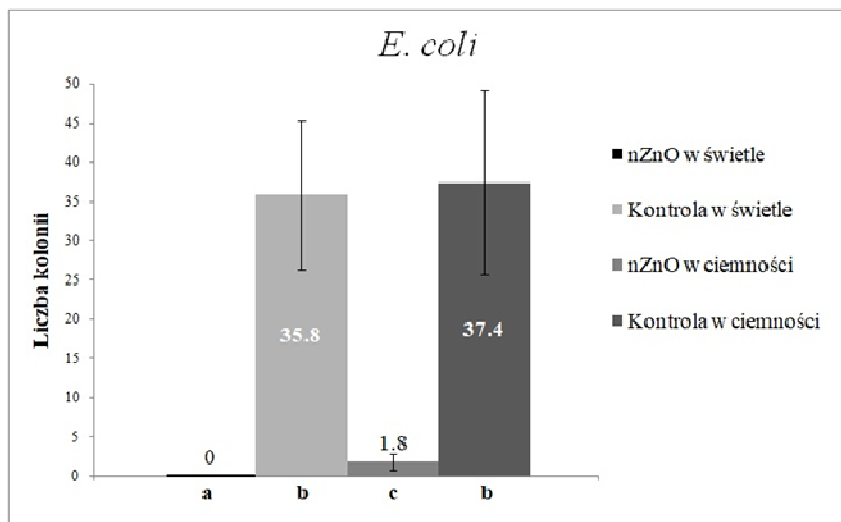
Wykres 1. Średnia liczba kolonii *Bacillus subtilis* w badanych grupach; wartości różniące się od siebie statystycznie oznaczono różnymi literami [opracowanie własne]

Zdj. 2. obrazuje wzrost *Escherichia coli* na płytkach szklanych kontrolnych i pokrytych nanowarstwą ZnO, inkubowanych w świetle i w ciemności. Rozwój kolonii bakteryjnych został wyraźnie zahamowany w obu grupach doświadczalnych. Różnice między grupami kontrolnymi nie zostały zaobserwowane (wyk. 2).

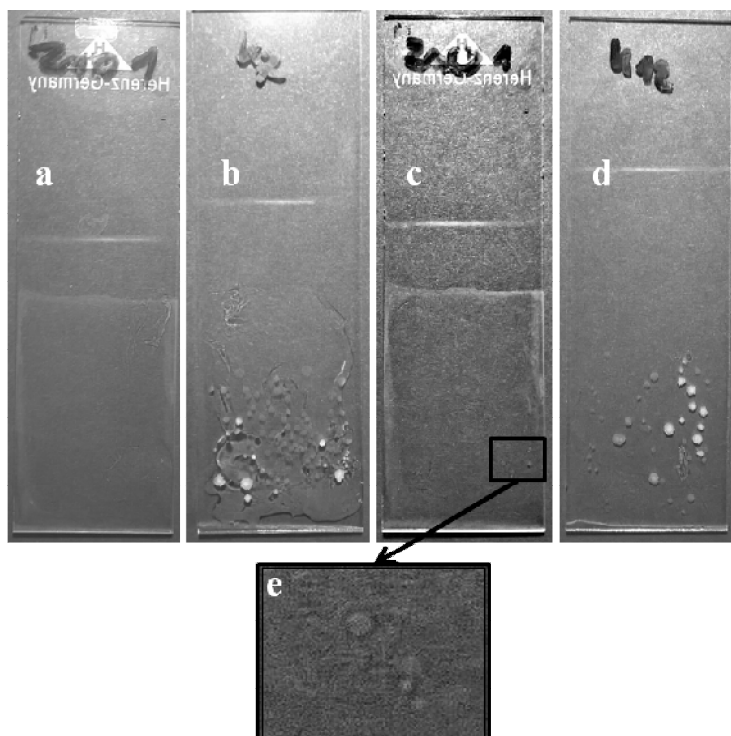
Podobnie jak w przypadku *B. subtilis* liczba kolonii *E. coli* na szkiełkach powleczonych nanoZnO inkubowanych w świetle wyniosła 0. Świadczy to o całkowitym zahamowaniu ich wzrostu przez wzbudzone światłem nanocząstki ZnO. Średnia liczba kolonii *E. coli* na szkiełkach z nanoZnO inkubowanych w ciemności wyniosła 1,8. Obrazuje to spadek bakteriobójczych właściwości nanocząstek ZnO związanych z powierzchnią wobec *E. coli*, w ciemności. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała wysoce istotny dodatni wpływ światła na antybakteryjne właściwości związanych z powierzchnią nanocząstek ZnO wobec *E. coli*.



Zdjęcie 1. Wzrost *Bacillus subtilis* na płytkach inkubowanych w świetle i w ciemności; a – płytka z nanoZnO inkubowana w świetle, b – płytka kontrolna inkubowana w świetle, c – płytka z nanoZnO inkubowana w ciemności, d – płytka kontrolna inkubowana w ciemności, e – powiększenie zaznaczonego fragmentu [opracowanie własne]



Wykres 2. Średnia liczba kolonii *Bacillus subtilis* w badanych grupach; wartości różniące się od siebie statystycznie oznaczono różnymi literami [opracowanie własne]



Zdjęcie 2. Wzrost *Escherichia coli* na płytkach inkubowanych w świetle i w ciemności; a – płytka z nanoZnO inkubowana w świetle, b – płytka kontrolna inkubowana w świetle, c – płytka z nanoZnO inkubowana w ciemności, d – płytka kontrolna inkubowana w ciemności, e – powiększenie zaznaczonego fragmentu [opracowanie własne]

#### 4. Dyskusja

Głównymi mechanizmami toksyczności nanocząstek ZnO są indukcja wytwarzania reaktywnych form tlenu i zdolność uwalniania jonów metali [21]. Nanocząstki ZnO są fotoaktywne i posiadają zdolność uwalniania RFT pod wpływem promieniowania świetlnego. Dane literaturowe pokazują, że bakterie gram-ujemne są bardziej podatne na działanie nanocząstek ZnO od bakterii gram-dodatnich [21]. Takowe różnice nie wystąpiły w zastosowanym przez autorów układzie doświadczenia. Toksyczność nanoZnO zależna jest także od ich stabilności chemicznej i poziomu agregacji cząstek [22, 23]. Nanocząstki związane z powierzchnią charakteryzują się dużą stabilnością chemiczną [24] a przytwierdzenie do podłoża zabezpiecza je przed agregacją. Użyte w doświadczeniu światło o natężeniu  $50 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  zapewniło efektywne wzbudzenie nanocząstek, pozytywnie wpływając na ich toksyczność wobec badanych szczepów bakterii. ANOVA wykazała wysoce istotną korelację pomiędzy nanoZnO i światłem widzialnym w hamowaniu wzrostu *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli*. Indukcja wytwarzania RFT i powodowanie stresu oksydacyjnego nie tłumaczy jednak bakteriobójczych właściwości nanoZnO wykazanych w warunkach zaciemnienia.

Ilość RFT wytwarzanych w komórkach bakteryjnych pod wpływem nanocząstek ZnO jest znikoma przy braku naświetlania [4]. Działanie antybakteryjne nanoZnO



w ciemności, do tej pory przypisywane było głównie wydzielaniu przez nanocząstki jonów metalu [25]. Ostatnie badania dowiodły jednak, że w przypadku nanocząstek związanych z powierzchnią rola jonów metalu w indukcji toksyczności jest znikoma. Wykazano także, że ilość uwalnianych jonów spada znacząco w ciemności [17]. Świadczy to, że uwalnianie jonów z nanocząstek związane jest z fotokorozją [26].

Autorzy sugerują, że silne pole elektryczne wytwarzane przez nanocząstki ZnO wpływa na ich toksyczność w ciemności. NanoZnO są silnymi dipolami i posiadają zdolność do wytwarzania miejscowego, jednorodnego pola elektrycznego [27, 28], które może destabilizować komórki bakteryjne powodując ich śmierć. Potwierdzenie tego mechanizmu wymaga jednak dalszych badań.

## 5. Wnioski

Związane z powierzchnią nanocząstki ZnO wykazywały silne właściwości bakteriobójcze. Nasilenie się bakteriobójczego działania nanocząstek pod wpływem światła świadczy o ich fotoaktywności. Zarówno *Escherichia coli* jak i *Bacillus subtilis* odznaczają się wysoką podatnością na działanie związanych z powierzchnią nanocząstek ZnO, zarówno w ciemności jak i w świetle. Potwierdzono, związany z indukcją wytwarzania RFT pod wpływem światła, mechanizm toksycznego oddziaływania nanoZnO na bakterie. W celu potwierdzenia mechanizmu toksyczności nienasświetlanych nanocząstek ZnO wobec bakterii konieczne jest wykonanie dalszych badań. Planowane są także dalsze badania mające na celu sprawdzenie wpływu grubości warstwy związanych z powierzchnią nanocząstek na jej właściwości antybakteryjne.

## Literatura

1. Chen Y., Fan Z., Zhang Z., Niu W., Li C., Yang N., Chen B., Zhang H., *Two-dimensional Metal Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, Chemical Reviews, (2018), Article ASAP.
2. Chaudhary S., Umar A., Bhasin K. K., Baskoutas S., *Chemical Sensing Applications of ZnO Nanomaterials*, Materials, 11, (2018), s. 287.
3. Wang Z.P., Lee Y.H., Horst A., Kang Y.H., Tang Y.J., Chen D.R., *Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles*, Chemosphere, 80, (2010), s. 525-529.
4. Dasari T.P., Pathakoti K., Hwang H-M., *Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co3O4 and TiO2) to E. coli bacteria*, Journal of Environmental Sciences, 25, (2013), s. 882-888.
5. Wang X., Ahmad M., Sun H., *Three-Dimensional ZnO Hierarchical Nanostructures: Solution Phase Synthesis and Applications*, Materials, 10, (2017), s. 1304.
6. Stoimenov P.K., Klinger R.L., Marchin G.L., Klabunde K.J., *Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents*, Langmuir, 18, (2002), s. 6679-6686.
7. Hewitt C.J., Bellara S.T., Andreani A., Nebe-von-Caron G., Mcfarlane C.M., *An evaluation of the antibacterial action of ceramic powder slurries using multiparameter flow cytometry*, Biotechnology Letters, 23, (2001), s. 667-675.
8. Becheri A., Dürr M., Lo Nostro P., Baglioni P., *Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: Application to textiles as UV-absorbers*, Journal of Nanoparticle Research, 10, (2008), s. 679-689.

9. Sawai J., Igarashi H., Hashimoto A., Kokugan T., Shimizu M., *Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method*, Journal of Chemical Engineering of Japan, 28, (1995), s. 288-293.
10. Sawai J., Kawada E., Kanou F., Igarashi H., Hashimoto A., Kokugan T., Shimizu M., *Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity*, Journal of Chemical Engineering of Japan, 29, (1996), s. 627-633.
11. Yamamoto O., Hotta M., Sawai J., Sasamoto T., Kojima H., *Influence of powder characteristic of ZnO on antibacterial activity effect of specific surface area*, Journal of the Ceramic Society of Japan, 106, (1998), s. 1007-1011.
12. Chang Y-N., Zhang M., Xia L., Zhang J., Xing G., *The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles*, Materials, 5, (2012), s. 2850-2871.
13. Toduka Y., Toyooka T., Ibuki Y., *Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species – Mediated fluorescence – Correlation with genotoxicity*, Environmental Science & Technology, 46, (2012), s. 7629-7636.
14. Zhang L., Jiang Y., Ding Y., Povey M., York D., *Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)*, Journal of Nanoparticle Research, 9, (2007), s. 479-489.
15. Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J., *Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions*, Water Research, 40, (2006), s. 3527-3532.
16. Cornejo-Garrido H., Kibanova D., Nieto-Camacho A., Guzmán J., Ramírez-Apan T., Fernández-Lomelín P., Garduño M.L., Cervini-Silva J., *Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions*, Chemosphere, 84, (2011), s. 1329-1335.
17. Visnapuu M., Rosenberg M., Truska E., Nõmmiste E., Šutka A., Kahru A., Rähn M., Vija H., Orupõld K., Kisand V., Ivask A., *UVA-induced antimicrobial activity of ZnO/Ag nanocomposite covered surfaces*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 169, (2018), s. 222-232.
18. Grass G., Rensing C., Solioz M., *Metallic copper as an antimicrobial surface*, Applied and Environmental Microbiology, 77, (2011), s. 1541-1547.
19. Lemire J.A., Harrison J.J., Turner R.J., *Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*, Nature Reviews Microbiology, 11, (2013), s. 371-384.
20. Villapun V.M., Dover L.G., Cross A., Gonzales S., *Antibacterial metallic touch surfaces*, Materials, 9, (2016), s. 736.
21. Nair S., Sasidharan A., Divya Rani V.V., Menon D., Nair S., Manzoor K., Raina S., *Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20, (2009), s. 235-241.
22. Kahru A., Dubourguier H.C., Blinova I., Ivask A., Kasemets K., *Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A Minireview*, Sensors, 8, (2008), s. 5153- 5170.
23. Auffan M., Rose J., Wiesner M.R., Bottero J.Y., *Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro*, Environmental Pollution, 157, (2009), s. 1127-1133.
24. Visnapuu M., Rosenberg M., Truska E., Nõmmiste E., Šutka A., Kahru A., Rähn M., Vija H., Orupõld K., Kisand V., Ivask A., *UVA-induced antimicrobial activity of ZnO/Ag nanocomposite covered surfaces*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 169, (2018), s. 222-232.
25. Aruoja V., Dubourguier H.C., Kasemets K., Kahru A., *Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata*, Science of the Total Environment, 407, (2009), s. 1461-1468.

26. Cao Y.Q., Chen J., Zhou H., Zhu L., Li X., Cao Z.Y., Wu D., Li A.D., *Photocatalytic activity and photocorrosion of atomic layer deposited ZnO ultrathin films for the degradation of methylene blue*, *Nanotechnology*, 26, (2015), 024002.
27. Hiremath R.K., Rabinal M.K., Mulimani B.G., Khazi I.M., *Molecularly Controlled Metal–Semiconductor Junctions on Silicon Surface: A Dipole Effect*, *Langmuir*, 24, (2008), s. 11300-11306.
28. Hodlur R.M., Rabinal M.K., Mohamed I.I., *Influence of dipole moment of capping molecules on the optoelectronic properties of ZnO nanoparticles*, *Journal of Luminescence*, 149, (2014), s. 317-324.

## **Wpływ fotoaktywnych, związanych z powierzchnią, nanocząstek ZnO na wybrane szczepy bakterii**

### Streszczenie

Nanocząstki, z uwagi na dużą powierzchnię w stosunku do objętości, cechują się wysoką aktywnością w tym aktywnością biologiczną. W pracy zbadano wpływ związanych z powierzchnią, fotoaktywnych nanoZnO na wybrane szczepy bakterii. Badano wpływ warstwy uzyskanej z zastosowaniem metody zol-żel nanoZnO na szkle, na szczepy bakterii z gatunków *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) i *Escherichia coli* (ATCC 35218) pozyskanych z 24h hodowli bulionowych. Wyodrębniono 2 grupy doświadczalne: bakterie inkubowane w świetle widzialnym (grupa I) i w ciemności (grupa II). Grupę kontrolną stanowiły hodowle na szkiełkach niepowleczonych warstwą. Na szkiełka z warstwą i bez warstwy nałożono bakterie, które następnie pokryto cienką warstwą agaru. Grupy doświadczalne I i II oraz grupę kontrolną poddano 24h inkubacji w 37°C, grupę I i część próbek kontrolnych w ciemności, a grupę II i pozostałe próbki kontrolne w świetle widzialnym. Po inkubacji przeliczono wyrosłe kolonie, a następnie dokonano analizy statystycznej. Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej jednoznacznie wskazały na wysoce istotne antybakteryjne działanie nanoZnO. Ponadto doświadczenie pozwoliło udowodnić zwiększoną biobójczą aktywność nanocząstek podczas naświetlania światłem widzialnym. Przeprowadzony eksperyment wskazuje na potencjał aplikacyjny nanoZnO pod kątem zastosowań w powłokach antybakteryjnych. Planowane są dalsze badania mające na celu sprawdzenie, czy i jak grubość warstwy nZnO wpływa na jej właściwości.

Słowa kluczowe: nanocząstki, bakterie, zol-żel, powierzchnia, fotoaktywność.

## **An effect of bound to surface, photoactive, ZnO nanoparticles on chosen bacteria strains**

### Abstract

Nanoparticles, due to their large specific surface area, are highly reactive and display bioactivity. In this study, an influence of photoactive ZnO nanoparticles on chosen bacteria strains is examined. The ZnO particles were deposited onto a glass substrate by sol-gel method. The bacteria strains from species *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) and *Escherichia coli* (ATCC 35218) acquired from 24h old broth colonies were used in the experiment. Two experimental groups were studied: I containing bacteria incubated in visible light, II incubated in the dark. The colonies on glass without layer were used as controls. Bacteria were spread on the glass and glass with layer surfaces, and later covered with thin agar layer. Incubations were carried out for 24 hours at temperature 37°C, respectively in the visible light (group I) and in the darkness (group II). Later the colonies were counted and statistical analysis was made. The results show good antibacterial properties of ZnO nanoparticles. It is also shown that bactericide properties increase when visible light is applied. The results are prospective in view of possible future applications of nano-ZnO as antibacterial medium. Further studies, in which an influence of a thickness of nano-ZnO layer on antibacterial properties are planned.

Keywords: nanoparticles, bacteria, sol-gel, surface, photoactivity.

# Wpływ dyspersji nanocząstek Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na wybrane parametry hodowli *L. plantarum* 299v

## 1. Wstęp

### 1.1. Zastosowanie bakterii mlekowych

Bakterie mlekowe (bakterie kwasu mlekowego, LAB, ang. *lactic acid bacteria*) stosowane są jako kultury starterowe lub jako mikroflora naturalnie rozwijająca się do produkcji fermentowanych produktów mlecznych, serów dojrzewających [1, 2]. LAB kontrolują wartości pH dojrzewającego mleka oraz kolejnych produktów mlecznych przez przemianę laktozy naturalnie występującej w mleku, do kwasu mlekowego w procesie fermentacji mlekowej. Redukcja wartości pH poniżej 5,3 w serze albo poniżej 4,6 w fermentowanych produktach mlecznych pozwala kontrolować mikroflorę, ponieważ w tych warunkach przetrwać mogą tylko bakterie tolerujące kwasy [3].

Bakterie mlekowe wykorzystywane są również do produkcji i konserwacji żywności pochodzenia roślinnego, np. kiszona kapusta kiszone ogórki, itp. Bakterie te biorą też udział w produkcji pasz dla zwierząt tzw. kiszonek.

Zastosowanie w produkcji żywności bakterii kwasu mlekowego eliminuje lub hamuje rozwój drobnoustrojów patogennych, toksynotwórczych i powodujących psucie żywności. Kwas mlekowy stosowany jest do konserwacji żywności [4]. Jest on także używany jako emulgator do gotowych ciast w przemyśle piekarniczym [5, 6].

Bakterie kwasu mlekowego wpływają również na smak produktów spożywczych. Głównymi czynnikami doprowadzającymi do rozwoju smaku przez szlaki biochemiczne takie jak glikoliza, lipoliza i proteoliza są enzymy wewnątrzkomórkowe uwalniane przez bakterie. Smak sera półtwardego i twardego wynika z działalności LAB, zwłaszcza poprzez wytworzenie wolnych aminokwasów i małowczątkowych peptydów, które następnie mogą być przekształcane do alkoholi, aldehydów, kwasów i estrów. Produkty mleczne wytwarzane dzięki fermentacji przeprowadzanej przez bakterie kwasu mlekowego to m.in. sery, jogurty [3].

Bakterie mlekowe, w tym *Lactobacillus plantarum* 299v, stosowane są również jako probiotyki [5]. Probiotyki polepszają wartość odżywczą żywności, w odpowiednich ilościach zapewniają korzyści zdrowotne osobie je przyjmującej. Dzięki bakteriom probiotycznym dochodzi w organizmie do zmniejszenia nietolerancji na laktozę, obniżenia cholesterolu we krwi, zwiększenia odpowiedzi immunologicznej

---

<sup>1</sup> a.jurkowski@wnb.uz.zgora.pl, Katedra Biotechnologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.wnb.uz.zgora.pl.

<sup>2</sup> monika.kierpiec@wp.pl, Katedra Biotechnologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.wnb.uz.zgora.pl.

<sup>3</sup> j.koziol@wnb.uz.zgora.pl, Katedra Biotechnologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.wnb.uz.zgora.pl.

i zapobieganiu nowotworom [3]. Przeprowadzono badania, w których *L. plantarum* wykorzystywano jako nośnik związków terapeutycznych w organizmie, wśród nich szczepionek, a wszystko dzięki możliwości przetrwania w ludzkim przewodzie pokarmowym [5].

Bakterie kwasu mlekowego m.in. *L. plantarum* oraz *L. fermentum* działają hamująco wobec grzybów powodujących psucie żywności. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe są związane z wytwarzanymi przez bakterie mlekowe aktywnymi antagonistycznymi metabolitami, obejmującymi kwasy takie jak mlekowy octowy, mrówkowy, propionowy, masłowy, hydroksyloxy i fталowy oraz innym związkom takim jak dwutlenek węgla, nadtlenuk wodoru, etanol, kwasy tłuszczowe, bakteriocyny lub substancje hamujące bakteriocyny [7].

Kwas mlekowy stosuje się również do produkcji biopolimerów. Mają one zastosowanie w medycynie jako rozkładalne i biokompatybilne implanty w osteosyntezie. Biopolimery na bazie kwasu mlekowego stosowane są także w branży opakowaniowej jako opakowania do napojów i produktów spożywczych, artykułów biurowych i gospodarstwa domowego. W przemyśle włókienniczym stosuje się kwas mlekowy do produkcji odzieży, dywanów i włókien. Dodatek tych biopolimerów poprawia właściwości materiału tj. odporność na zgniecenia, podatność na układanie, elastyczność i wytrzymałość [6].

Kwas mlekowy stosowany jest w przemyśle tekstylnym oraz garbarskim w procesie barwienia i do odwapniania skór zwierzęcych oraz do produkcji rozpuszczalników [6]. Kwas mlekowy zastosowanie znajduje również w przemyśle kosmetycznym i farmaceutycznym [6, 8]. Dzięki działaniu przeciwpróchniczym kwas ten stosowany jest także w pastach do zębów. Kolejnym zastosowaniem kwasu mlekowego jest również produkcja herbicydów oraz produkcja polimerów biodegradowalnych np. polilaktydu (PLA) [6, 9].

## 1.2. Produkcja kwasu mlekowego

Kwas mlekowy może być otrzymywany metodami chemicznymi oraz biochemicznymi. Roczna światowa produkcja kwasu mlekowego szacowana jest na 80 tys. ton, z czego 90% kwasu mlekowego jest wytwarzane w procesie fermentacji, a jedynie 10% w procesie hydrolizy nityrylu kwasu mlekowego [6]. Syntetyczna metoda produkcji kwasu mlekowego polega na hydrolizie laktonityrylu, uprzednio otrzymanego z cyjanowodoru i aldehydu octowego [10], oraz na surowcach petrochemicznych [8]. Czysty produkt może być otrzymany w procesie fermentacji (pod warunkiem zastosowania odpowiedniego szczepu LAB), natomiast w syntezie chemicznej otrzymywana jest mieszanina racemiczna, która może zostać rozdzielona na enancjomery. Czystość produktu zależy od użytego substratu [6, 10], oraz wybranego do syntezy mikroorganizmu oraz warunków wzrostu. W syntezie kwasu mlekowego w procesie fermentacji można wykorzystywać tanie surowce bogate w węglowodany. Fermentacja jest uznawana za najskuteczniejszy sposób wytwarzania tego kwasu [10].

Najwyższą czystość kwasu mlekowego otrzymuje się przy użyciu sacharydów. Wysoka cena sacharydów skłania do poszukiwań tańszych substratów. Dlatego też duże zastosowanie w procesie fermentacji znalazła skrobia (jako mieszanina polisacharydów) – dzięki jej dostępności w dużych ilościach i niskiej cenie. Jest ona

również odnawialnym substratem, który nie obciąża środowiska emisją zanieczyszczeń. Mimo tych zalet najczęściej stosowanym substratem w fermentacji mlekowej jest glukoza [6].

Surowce do produkcji kwasu mlekowego metodą fermentacji mikrobiologicznej można uzyskać z zasobów odnawialnych [8]. Wykorzystywane są takie surowce jak:

- odpady przemysłowe: serwatka i melasa;
- materiały skrobiowe: pszenica, ziemniaki, kukurydza, ryż, maniok, sorgo, owies, jęczmień, żyto;
- produkty celulozowe: słoma pszenna, kukurydziana i ryżowa, makulatura, drewno odpadowe [11].

Proces otrzymywania kwasu mlekowego obejmuje:

- obróbkę wstępną substratu (opcjonalnie hydroliza do cukrów prostych),
- fermentację cukrów do kwasu mlekowego,
- rozdział bakterii i substancji stałych od płynnego produktu fermentacji,
- oddzielenie kwasu mlekowego [6].

### 1.3. *Lactobacillus plantarum* 299v

*L. plantarum* to gatunek należący do heterofermentacyjnych fakultatywnych bakterii kwasu mlekowego. Genom koduje wszystkie enzymy szlaku glikolizy oraz fosfoketolazy pentozowej, odpowiadającej za przemiany kwasu pirogronowego do produktów końcowych fermentacji mlekowej [5].

*L. plantarum* naturalnie zasiedla przewód pokarmowy człowieka [5] i innych ssaków [12]. Ich liczebność w organizmie ludzi i zwierząt może być różna w zależności od gatunku, lokalizacji w jelitach oraz wieku gospodarza [12]. Znajduje się również w żywności sfermentowanej pochodzenia roślinnego [13].

*L. plantarum* jest gatunkiem spotykanym w różnych niszach środowiska, ponieważ posiada zdolność łatwego przystosowywania się [5].

*L. plantarum* przyswaja cholesterol, ale również dekoniuje sole żółciowe, posiada niewrażliwość na żółć [14; 15].

*L. plantarum* 299v (DSM 9843) [16] jest szczepem probiotycznym, dającym korzystne skutki dla zdrowia konsumenta [5, 16]. Szczep bytuje na błonie śluzowej jelita grubego u człowieka *in vivo* dzięki białkom posiadającym zdolność łączenia się z komórkami gospodarza poprzez wiązanie mannozy [13, 16]. Zwiększa również ilość kwasu karboksylowego, a szczególnie kwasu octowego i kwasu propionowego w kale zdrowych osobników, co wpływa korzystnie dla błony śluzowej jelit [13, 16].

*L. plantarum* 299v wykazuje działanie przeciwbakteryjne przeciw kilku czynnikom chorobotwórczym, takimi jak *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* [13, 16]. Przy zwiększonej syntezie oraz selekcji interleukiny 10 w limfocytach T i makrofagach podczas zapalenia okrężnicy wykazuje korzystną aktywność immunomodulacyjną [16]. Obniża stężenie fibrynogenu we krwi. Zmniejsza translokację bakterii jelitowych czyli przejście przez nabłonek żywych kultur bakterii do blaszki właściwej i do węzłów chłonnych krezkowych oraz do innych tkanek. Przy uszkodzeniu wątroby zmniejsza stan zapalny błony śluzowej i poprawia jej stan immunologiczny [13].

Badania wykazały, iż szczep ten wykazuje korzyści w leczeniu zespołu jelita drażliwego w łagodzeniu objawów, szczególnie bólu brzucha i wzdęć [13, 16].

## 2. Cel pracy

Celem przeprowadzonych badań było stwierdzenie w jaki sposób stopień dyspersji nanocząstek tlenku żelaza(II) diżelaza(III) wpływa na wybrane parametry w tym produktywność hodowli okresowej *Lactobacillus plantarum* 299v.

## 3. Materiał i metody

### 3.1. Bakterie probiotyczne

W badaniach wykorzystywano bakterie probiotyczne *L. plantarum* 299v (DSM 9843) pochodzące z Niemieckiej Kolekcji Mikroorganizmów.

### 3.2. Hodowle okresowe

Hodowle okresowe *L. plantarum* 299v prowadzono w kolbach 300 ml w łaźni wodnej z wytrząsaniem w temp. 37°C. Jako medium hodowlane stosowano mleko odtłuszczone (BTL sp. z o.o.). W każdej kolbie do 290 ml mleka dodano 10 ml 24 godzinnej hodowli *L. plantarum* 299v w bulionie MRS (MerckMillipore). W celu zbadania wpływu stopnia dyspersji nanocząstek na parametry hodowli stosowano nanocząstki  $Fe_3O_4$  o stopniu dyspersji 15-20 nm oraz 20-30 nm (US Research Nanomaterials, Inc., USA). Badania prowadzono dla dwóch stężeń nanocząstek: 2 mg/ml i 4 mg/ml. Dla każdej badanej próby wykonano także próbę kontrolną nie zawierającą nanocząstek. Hodowle wykonano w trzech powtórzeniach.

### 3.3. Pomiary wybranych parametrów hodowli

Pomiary wartości pH oraz stężenia kwasu mlekowego były prowadzone w równych odstępach czasowych: 0, 24, 48 i 72h od rozpoczęcia hodowli. Wartości pH mierzono przy użyciu pH-metru MULTIFUNCTION METER Cx-501 firmy ELMETRON. Stężenia kwasu mlekowego mierzono za pomocą reflektometru RQflex plus (MerckMillipore).

## 4. Analiza wyników

### 4.1. Wartość pH pożywki hodowlanej.

Wartości pH pożywki w trakcie hodowli z nanocząstkami tlenku żelaza(II) diżelaza(III) o stężeniu 2mg/ml zostały zestawione w tabeli 1. Natomiast dla hodowli z  $Fe_3O_4$  o stężeniu 4mg/ml zostały zamieszczone w tabeli 2. Wyniki poddano analizom statystycznym testem t-Studenta. Dla hodowli z nanocząstkami o stężeniu 2 mg/ml i o dyspersji 15-20 nm po 48h i 72h hodowli zachodziło istotne statystycznie obniżenie pH pożywki. Natomiast dla nanocząstek o tym samym stężeniu ale o dyspersji 20-30 nm istotne statystycznie obniżenie pH otrzymano po 72h hodowli.

Natomiast w hodowli o stężeniu nanocząstek 4 mg/ml i dyspersji 15-20 nm i 20-30 nm również obniżają wartość pH pożywki po 72 h hodowli.

Tabela 1. Wartości pH pożywki hodowlanej w trakcie hodowli dla użytego stężenia nanocząstek 2 mg/ml

Czas hodowli h	Kontrola		Hodowla z Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 15-20 nm		Test t-studenta	Hodowla z Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 20-30 nm		Test t-studenta
	średnia	odch. standard	średnia	odch. standard		średnia	odch. standard	
0	7,141	0	7,123	0	-	7,141	0	-
24	5,489	0,255	5,387	0,206	0,162	5,258	0,248	0,233
48	4,779	0,065	4,716	0,052	0,014*	4,679	0,048	0,131
72	4,575	0,038	4,487	0,046	0,004**	4,483	0,016	0,041*

\* p<0,05

\*\* p<0,01

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 2. Wartości pH pożywki hodowlanej w trakcie hodowli dla użytego stężenia nanocząstek 4 mg/ml

Czas hodowli h	kontrola		Hodowla z Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 15-20 nm		Test t-Studenta	Hodowla z Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> 20-30 nm		Test t-Studenta
	średnia	odch. standard	średnia	odch. standard		średnia	odch. standard	
0	7,005	0	7,26	0	-	7,172	0	-
24	4,995	0,115	4,971	0,081	0,488	4,877	0,079	0,137
48	4,589	0,027	4,527	0,020	0,055	4,530	0,008	0,064
72	4,471	0,032	4,391	0,037	0,015*	4,388	0,017	0,022*

\* p<0,05

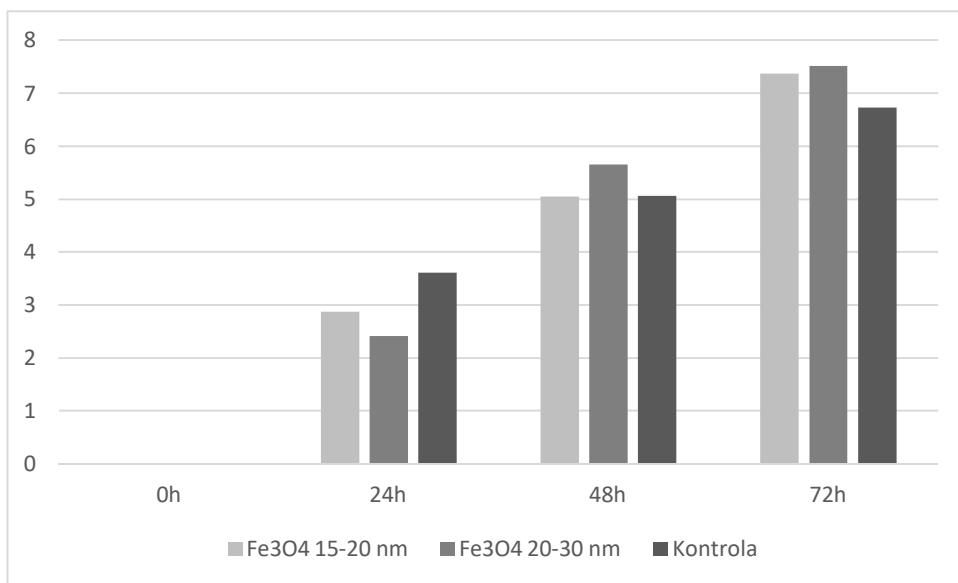
\*\* p<0,01

Źródło: Opracowanie własne

## 4.2. Stężenie kwasu mlekowego

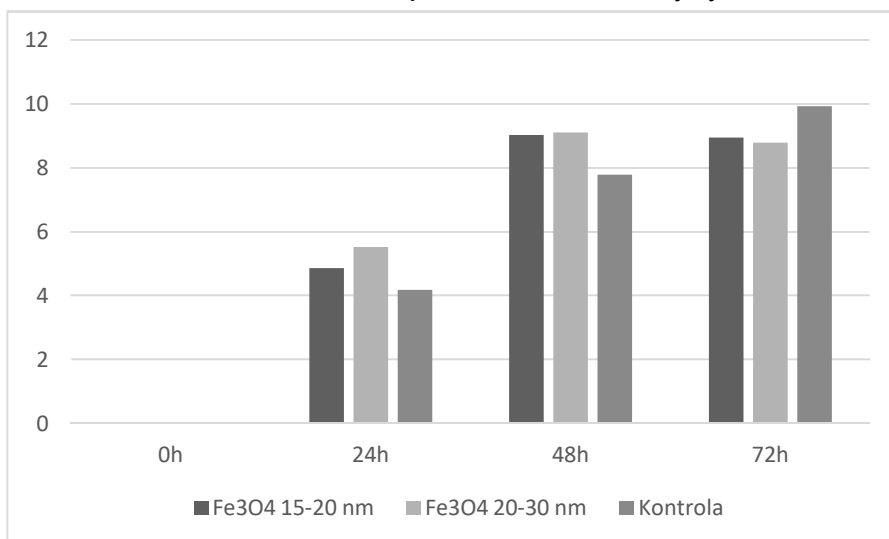
W trakcie hodowli mierzono stężenie kwasu mlekowego w pożywce hodowlanej metodą refraktometryczną przy użyciu refraktometru Reflectoquant Q 10 plus (za pomocą pasków testowych, zakres pomiaru 3,0-60 mg/l). Wyniki przedstawiono odpowiednio na wykresach 1 i 2. Wyniki poddano analizom statystycznym testem t-Studenta. Z analizy statystycznej wynika, że zastosowanie nanocząstek Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> o stężeniu 2 mg/ml powoduje wzrost produktywności bakterii *L. plantarum* 299v w hodowlach po 72h hodowli przy użyciu nanocząstek o dyspersji 15-20 nm.





Wykres 1. Stężenie kwasu mlekowego [mg/ml] dla stężenia nanocząstek 2 mg/ml [opracowanie własne]

W hodowlach o stężeniu nanocząstek 4 mg/ml uzyskiwano wyższe stężenia kwasu mlekowego w początkowych etapach hodowli (24 i 48h), zarówno dla nanocząstek o dyspersji 15-20 nm jak i 20-30 nm. Jednakże istotne statystycznie różnice otrzymano tylko dla pomiarów po 48 h (dla obu wariantów dyspersji). Po 72 h zaobserwowano spadek stężenia kwasu mlekowego w pożywce hodowlanej w stosunku do kontroli. Jednakże nie są to różnice istotne statystycznie.



Wykres 2. Stężenie kwasu mlekowego [mg/ml] dla stężenia nanocząstek 4 mg/ml [opracowanie własne]

## 5. Wnioski

Praca stanowi kontynuację przeprowadzonych wcześniej badań, które wykazały pozytywny wpływ nanocząstek tlenku żelaza(II) diżelaza(III) o dyspersji 20 nm na przeżywalność bakterii probiotycznych *Lactobacillus acidophilus* [17] oraz wpływ na produktywność *L. rhamnosus* GG [18].

W badaniach wybranych parametrów hodowli okresowej *Lactobacillus plantarum* 299v wykazano, że:

- wielkość nanocząstek tlenku żelaza(II) diżelaza(III) stosowanych w prowadzonych hodowlach okresowych *L. plantarum* 299v nie wpływa znacząco na zmianę wartości pH pożywki hodowlanej;
- zastosowanie nanocząstek  $Fe_3O_4$  w stężeniu 2 mg/ml i o dyspersji 15-20 nm powoduje wzrost produktywności kwasu mlekowego bakterii po 72h;
- zastosowanie nanocząstek tlenku żelaza(II) diżelaza(III) w stężeniu 4 mg/ml powoduje wzrost produktywności kwasu mlekowego 48 h. Natomiast po 72 h brak istotnych różnic w produktywności kwasu mlekowego bakterii w stosunku do kontroli.

Otrzymane wyniki dają możliwość praktycznego wykorzystania nanocząstek  $Fe_3O_4$  w przemysłowej produkcji kwasu mlekowego, oczywiście po wcześniejszym przeprowadzeniu optymalizacji warunków przy przejściu od skali laboratoryjnej do przemysłowej.

## Podziękowania

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego MINIATURA1 (DEC-2017/01/X/NZ3/00715) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

## Literatura

1. Borawska J., Miksaron M., Darewicz M. *The physiological state of Lactococcus lactis and Propionibacterium freudenreichii strains in co-cultures induced by low temperature and osmotic stress*. African Journal of Microbiology Research, 7, (2013), s. 3794-3801.
2. Abriouel H., del Carmen M., Casado M., Lavilla Lerma L., Pérez Montoro B., Bockelmann W., Pichner R., Kabisch J., Cho G., Franz Ch., Gálvez A., Benomara N. *New insights in antibiotic resistance of Lactobacillus species from fermented foods*. Food Research International 78, (2015), s. 465-481.
3. Hickey C. D., Sheehan J. J., Wilkinson M. G., Auty M. A. E. *Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review*. Front. Microbiol. 6, (2015), s. 1-8.
4. Kraszewska J., Wzorek W., Wojtasik I. *Wpływ warunków hodowli szczepów z gatunku Lactobacillus plantarum na ich aktywność antagonistyczną*. Żywność: nauka-technologie-jakość 13, (2006), s. 153-161.
5. Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Tarchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W., Stiekema W., Lankhorst R.M., Bron P.A., Hoffer S.M., Groot M.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M., Siezen R.J. *Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100. (2003), s. 1990-1995.
6. Rohde C., Raphael N., Jager J. *Badania laboratoryjne i techniczne fermentacji mlekowej odpadów organicznych*. Ochrona Środowiska, 1, (2007), s. 41-44.

7. Fowoyo P. T., Uzoma E. O. *Studies on the Antifungal Activity of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus fermentum on Spoilage Fungi of Tomato Fruit*, Journal of Microbiology Research, 5, (2015), s. 95-100.
8. Wee, Y. J., Kim, J. N., Ryu, H. W. *Biotechnological production of lactic acid and its recent applications*. Food Technology and Biotechnology, 44, (2006), s. 163-172.
9. Kwiatkowska M., Kozłowski M. *Formowanie włókien poli(kwasu mlekowego) metod elektroprzędzenia z roztworu w różnych układach rozpuszczalników*. Polimery, 60, (2015), s. 480-485.
10. Vijayakumar J., Aravindan R., Viruthagiri T. *Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid*, 22, (2008), s. 245-264.
11. Maślanka S., Kos A., Bańczyk M., Czopek I., Adam Ł. *Study of concentration of lactic acid obtained in the process of lactic fermentation of lactose contained in the spent whey using Lactobacillus*. CHEMIK 69, (2015), s. 241–251.
12. de Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., de Vos W.M. *Lactobacillus plantarum –survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract*. International Dairy Journal 16, (2006), s. 1018-1028.
13. Molin, G. *Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to Lactobacillus plantarum 299v*. The American journal of clinical nutrition, 73, (2001), s. 380-385.
14. Amutha K., Kokila V. *Cholesterol Lowering Property of Lactobacillus plantarum Isolated from Cow Milk*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 6, (2015), s. 1184-1189.
15. Rzepkowska A., Zielinska D., Kolozyn-Krajewska D. *Przeżywalność szczepów Lactobacillus wyizolowanych z żywności w warunkach modelowego przewodu pokarmowego*. Żywność Nauka Technologia Jakość, 22, (2015), s. 42-52.
16. Ducrotté P., Sawant P., Jayanthi V. *Clinical trial: Lactobacillus plantarum 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome* World journal of gastroenterology, 18, (2012), s. 4012-4018.
17. Jurkowski A., Zapotoczny B., Kozioł J.J., Dudek M.R. *The Effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles on Survival of Probiotic Bacteria Lactobacillus acidophilus PCM2499 at Lower pH*. Polish Journal of Microbiology, 64, (2015), s. 307-310.
18. Jurkowski A., Szczepańska I., Kozioł J.J. *Wpływ nanocząstek tlenku żelaza na produkcję kwasu mlekowego w hodowli okresowej Lactobacillus rhamnosus GG*. W: / Mikrobiologia medyczna i środowiskowa – wybrane zagadnienia, red. Maciąg M., Maciąg K.- Lublin: Wydaw. Naukowe Tygiel sp. z o.o., (2017), s. 28-35.

## Wpływ dyspersji nanocząstek Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na wybrane parametry hodowli *L. plantarum* 299v

### Streszczenie

Bakterie mlekowe stosowane są powszechnie jako kultury starterowe w produkcji fermentowanej żywności jak również jako preparaty probiotyczne. Bakterie mlekowe stosowane są także w przemysłowej produkcji kwasu mlekowego. Kwas mlekowy jest obecnie powszechnie wykorzystywany w wielu gałęziach przemysłu. Stosowany jest w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym, chemicznym, tekstylnym i w produkcji biodegradowalnych tworzyw sztucznych.

Optymalizacja mikrobiologicznego procesu produkcji kwasu mlekowego jest wciąż aktualnym tematem badań naukowych. Jednym ze sposobów proponowanych przez badaczy jest zastosowanie nanocząstek Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

W pracy zastosowano nanocząstki tlenku żelaza(II) diżelaza(III) w celu wykazania wpływu na wybrane parametry hodowli (m. in. na produktywność) bakterii mlekowych *L. plantarum* 299v.

Uzyskane wyniki sugerują możliwość praktycznego wykorzystania nanocząstek  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  w przemysłowej produkcji kwasu mlekowego, oczywiście po wcześniejszym przeprowadzeniu optymalizacji warunków przy przejściu od skali laboratoryjnej do przemysłowej.

Słowa kluczowe: bakterie mlekowe, hodowla okresowa, kwas mlekowy, *L. plantarum*, nanocząstki  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### **Effect of $\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanoparticles dispersion on selected culture parameters of *L. plantarum* 299v**

#### Abstract

Lactic acid bacteria are commonly used as starter cultures in the production of fermented foods as well as probiotics. Lactic acid bacteria are also used in the industrial production of lactic acid. Lactic acid is now widely used in many industries. It is used in the food, pharmaceutical, cosmetics, chemical, textile industry and in the production of biodegradable plastics.

The optimization of the microbiological process of lactic acid production is still an ongoing topic of scientific research. One of the methods proposed by researchers is the use of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles.

Iron oxide (II, III) nanoparticles were used in the work to demonstrate the effect on selected culture parameters (including productivity) of lactic acid bacteria *L. plantarum* 299v.

Obtained results suggest the possibility of practical use of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles in the industrial production of lactic acid, of course after prior optimization of conditions at scale from laboratory to industrial scale.

Keywords: nanoparticle  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , lactic acid, lactic acid bacteria, *L. plantarum*, bath culture.

## Działanie pelargoniowego olejku eterycznego na *Bacillus* spp.

### 1. Wprowadzenie

Olejki eteryczne są produktami metabolizmu wtórnego roślin, a chemicznie to mieszaniny związków aromatycznych pozyskanych z różnych ich części: liści, skórki owoców, kwiatów, pąków czy nasion [1, 2]. Mogą być otrzymany z surowca wyjściowego za pomocą różnych metod, z których najczęściej stosowaną jest destylacja z parą wodną. Skład opisywanych mieszanin jest bardzo różny, a liczba ich komponentów może sięgać nawet kilkuset pojedynczych związków chemicznych. Jednak w większości, w każdym olejku eterycznym obecne są terpeny (monoterpeny i seskwiterpeny), aldehydy, alkohole, fenole, terpenoidy i inne [1]. Liczne testy potwierdzają bakteriobójcze i bakteriostatyczne właściwości olejków. Jako substancje o wysokiej lipofilności, z łatwością przenikają przez ścianę i błonę komórkową mikroorganizmów, doprowadzając do zaburzeń czynnościowych w obrębie komórki, a w konsekwencji jej śmierci [2]. Różne olejki eteryczne mają biologiczne właściwości, które mogą być, i są używane prewencyjnie jak również do leczenia powstałych już chorób, wywołanych między innymi przez zakażenia drobnoustrojami patogennymi. Wiele olejków jest wysoce aktywnych wobec bakterii zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych, grzybów i wirusów. Coraz więcej w medycynie spotyka się przypadków lekooporności patogenów na dostępne środki farmakologiczne, dlatego bada się działanie destylatów roślinnych na drobnoustroje, aby móc wprowadzić je jako element terapii leczniczej lub czynnik wzmacniający antymikrobowe działanie dostępnych farmaceutyków [3]. W chwili obecnej naukowcy dużo czasu poświęcają poznaniu zdolności olejków eterycznych do zwalczania szczepów bakteryjnych i grzybiczych w produktach rolnych czy preparatach kosmetycznych. Badane są również właściwości antyoksydacyjne destylatów, które to odpowiadają za konserwację produktów spożywczych, zarówno pochodzenia zwierzęcego jak i roślinnego. Dodatkowym atutem jest również wzmacnianie zapachu i smaku wytworów zawierających olejki eteryczne [4].

### 2. Olejek eteryczny z *Pelargonium graveolens*

Rodzaj *Pelargonium* należy do rodziny *Geraniaceae*, do której zaliczane są również: *Geranium*, *Erodium*, *Monsonia*, *Hypseocharis*, *Rhynchotheca* i *Sarco-caulon*. W obrębie rodzaju *Pelargonium* wyróżnia się ponad 250 gatunków, które różnią się między sobą cechami morfologicznymi oraz wyglądem zewnętrznym [5].

---

<sup>1</sup> a.pacia@o2.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opole, www.uni.opole.pl.

<sup>2</sup> mnabrdalik@uni.opole.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opole, www.uni.opole.pl.

<sup>3</sup> agna@uni.opole.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opole, www.uni.opole.pl.

Olejek eteryczny pozyskiwany jest z liści, kwiatów oraz łodyg pelargonii [3]. Największym producentem olejku z omawianej rośliny są Chiny, a zaraz za nimi Egipt, Algieria, Maroko i Wyspa Reunion [6]. Olejek pelargoniowy jest bardzo ceniony w wielu gałęziach przemysłu, m.in. w perfumerii, kosmetyce, farmaceutyce, a także w przemyśle spożywczym [7].

Charakterystyczna dla pelargoniowego olejku eterycznego jest duża zawartość cytronelolu, geraniolu, linalolu, izomentonu, w połączeniu z estrami, takimi jak np. mrówczan cytronelolu. W zależności od stosunku poszczególnych związków chemicznych, olejki różnią się kolorem. Mogą przyjmować postać od jasno żółtych, przez żółto-zielone, jasnozielone, aż po substancje o głębokiej zielonej barwie. Skład olejku eterycznego wpływa również na jego zapach. I tak nuty zapachowe wahają się od słodkich różanych przez delikatne różano-owocowe, aż po intensywnie kwiatowe, różane wonie. [6]. Pelargoniowy olejek znalazł zastosowanie w leczeniu: czerniaka, biegunki, wrzodów żołądka, cukrzycy, nowotworów i chorób skórnych [3]. Używany jest również w celach kosmetycznych, chociażby do walki z cellulitem [8] czy pielęgnacji cery tłustej [9].

Warunki środowiska, zarówno biotyczne i abiotyczne modulują ostateczny skład chemiczny olejku eterycznego. Do czynników biotycznych zaliczamy uwarunkowania, takie jak: obecność chwastów czy niepożądanych mikroorganizmów w glebie lub też infekujących roślinę. Obecność chwastów w miejscach uprawy pelargonii może powodować utratę ich biomasy aż o 50%, a także utratę wydajności w produkcji olejku eterycznego aż do 60%. Zmniejszeniu ulega zawartość dwóch kluczowych związków chemicznych – cytronelolu oraz geraniolu [6]. Do abiotycznych czynników wpływających na jakość pozyskanego olejku zaliczamy: warunki środowiskowe panujące na obszarze geograficznym, na którym wzrastały rośliny, takie jak natężenie światła, temperatura, wilgotność, jakość podłoża, część rośliny, która została użyta, jej wiek, pora roku, w której został zebrany materiał roślinny, czas jego suszenia po zbiorze, warunki przechowywania suszu, rodzaj użytej metody destylacji surowca oraz czas jej trwania [6,7,10].

### 3. *Bacillus* spp.

Rodzaj *Bacillus* liczy obecnie ponad 200 gatunków [11] i należy do rodziny *Bacillaceae* obejmującej, zgodnie z aktualnym podziałem taksonomicznym, 17 rodzajów [12].

Bakterie z rodzaju *Bacillus* stanowią Gram-dodatnie, cylindryczne, zwykle ruchliwe, urzęsione komórki. Wyjątkiem jest gatunek *B. anthracis*, który nie wykazuje zdolności ruchu. Do wzrostu mikroorganizmy te potrzebują warunków tlenowych bądź względnie beztlenowych. Charakteryzują się wysokim stopniem zróżnicowania fizjologicznego oraz metabolicznego uwarunkowanego różnorodnością genetyczną. Określa je również duża szybkość wzrostu. Bakterie te bytują w środowiskach o dużej rozpiętości temperatur, pH oraz zasolenia. W obrębie rodzaju wyróżnić można zarówno organizmy termofilne, izolowane z gorących źródeł wulkanicznych, gejzerów jak i psychrofilne, rosnące w temperaturze 0°C. Bakterie z rodzaju *Bacillus* są szeroko rozpowszechnione w naturze. Izoluje się je ze środowiska zewnętrznego: gleby, wód słodkich oraz słonych, a także z przewodu pokarmowego zwierząt oraz z psującej się żywności. Bakterie te zdolne są do

tworzenia endospor, co pozwala im przeżyć w tak różnych środowiskach, także tych o niesprzyjających parametrach fizykochemicznych [13]. Formy przetrwalne, ze względu na odmienną budowę niż formy wegetatywne – wysokie odwodnienie komórki, uszczelnienie ściany komórkowej, wytworzenie dużej ilości ciepłopornych białek, sprawiają ogromne problemy z ich dekontaminacją [14].

Co więcej, większość z nich stanowią gatunki bezpieczne dla ludzi i zwierząt – posiadają status GRAS (ang. *Generally Recognized As Safe*) przyznawany przez Światową Komisję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*), wyjątek stanowi patogenny gatunek *B. anthracis* oraz blisko z nim spokrewniony *B. cereus*. Cechy te sprawiają, że bakterie *Bacillus* spp. są często wykorzystywane do produkcji preparatów komercyjnych, w tym enzymów, antybiotyków, insektycydów, witamin, a także innych metabolitów (kwas hialuronowy, poligalakturnowy). Dużą ich zaletą jest to, że są zdolne do wydzielania wielu białek na zewnątrz komórki. Szacuje się, że połowa powstających preparatów enzymatycznych otrzymywana jest z udziałem właśnie bakterii z rodzaju *Bacillus*. Zalicza się do nich proteazy, amylazy ( $\alpha$ -amylazy stanowią 25% i produkowane są głównie przez bakterie *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, a także *B. subtilis*), pullulanazy czy izomerazy. Enzymy te stosowane są obecnie w przemyśle spożywczym, chemicznym, tekstylnym, papierniczym, a także farmaceutycznym [13].

Obecność *B. cereus* w produktach spożywczych wiąże się z dużym zagrożeniem dla zdrowia konsumentów. Wytwory zbożowe, makarony, ryż, płatki, a także mięso, mleko, sosy czy desery to środowiska, które są źródłami odnotowanych przypadków zachorowań związanych z Gram-dodatnią *B. cereus* (laseczka woskowa). Duże podobieństwo fenotypowe to tego gatunku wykazują *B. thuringiensis*, *B. anthracis* (laseczka wąglika) oraz *B. mycoides*. *B. mycoides* tworzy charakterystyczne, rizoidalne (rozgałęzione jak mróz na szybie) kolonie [11].

*Bacillus subtilis* (laseczka sienna) posiada dużą zdolność do wytwarzania antybiotyków polipeptydowych, enzymów zewnątrzkomórkowych, toksyn oraz innych metabolitów. Charakteryzuje ją ogromna zdolność adaptacyjna do zmieniających się warunków środowiska może rosnąć w temperaturze sięgającej nawet 60-70°C, stąd zwana jest laseczką termotolerancyjną. Zgodnie z klasyfikacją mikroorganizmów będącą załącznikiem do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych, bakterie *B. subtilis* zostały zaliczone do 2. grupy ryzyka czyli uważane są za bezpieczne, natomiast mogące wywołać zatrucia pokarmowe u osób z obniżoną odpornością [12].

Celem przeprowadzonych badań było określenie aktywności olejku pelargoniowego wobec *Bacillus* spp.

#### **4. Materiał i metody**

Z własnej uprawy *Pelargonium graveolens* zebrano liście, z wyłączeniem ogonków (wcześniejsze badania dowiodły, że ogonki liściowe są niewydajne pod względem pozyskania olejku), które następnie rozdrobnilo i przeniesiono do aparatu Clevengera, gdzie poddane zostały 3-godzinnej hydrodestylacji. Świeżo otrzymany olejek eteryczny charakteryzował się jasnozielonym kolorem oraz intensywnym i niezbyt przyjemnym zapachem. Następnie część pozyskanej substancji przeznaczono do badań mikrobiologicznych, a resztę przesłano do

Centralnego Laboratorium Agroekologicznego Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, gdzie poddana została analizie jakościowej i ilościowej za pomocą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Do momentu wysłania do tego laboratorium, próbę przechowywano w chłodnym miejscu bez dostępu światła słonecznego.

Chromatografia gazowa jest powszechnie używaną techniką do analizy związków aromatycznych, w tym olejków eterycznych. Służy do oddzielenia poszczególnych składników za pomocą odpowiedniego ciśnienia [15].

Materiał mikrobiologiczny do badań stanowiły wyizolowane z gleby i psującej się żywności następujące szczepy: *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pumilus* oraz *B. amyloliquefaciens*.

W badaniach użyto dwie metody: seryjnych rozcieńczeń w agarze oraz seryjnych rozcieńczeń w bulionie. Miały one na celu określenie wartości MIC (ang. Minimal Inhibitory Concentration) oraz MBC (ang. Minimal Bactericidal Concentration) dla wykorzystanego olejku eterycznego.

Wszystkie badane szczepy *Bacillus* hodowano przez 24 h na podłożu agarowym, a następnie przygotowano z nich inokulum o gęstości 0,5 w skali McFarlanda poprzez zawieszenie kolonii w płynie fizjologicznym z dodatkiem Tweenu 80. Sporządzono 10% wyjściowy roztwór olejku w etanolu.

#### 4.1. Metoda seryjnych rozcieńczeń w agarze

Do upłynnionego podłoża Mueller-Hinton (45°C) wprowadzono alkoholowe roztwory olejku w ilości odpowiadającej stężeniom: 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 oraz 10,0 µl/ml, a następnie dodano po 100 µl inokulum bakterii, tak że całość mieszaniny wynosiła w każdej próbie 10 ml. Materiał wymieszano i wylano na sterylne szalki Petriego, pozostawiono do wystygnięcia i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C. Po tym czasie określono wzrost mikroorganizmów na podłożu oraz wyznaczono wartości MIC. Najniższe stężenie roztworu pelargoniowego olejku eterycznego, przy którym nie rozwija się więcej niż jedna kolonia, wyznaczała jego wartość MIC.

#### 4.2. Metoda seryjnych rozcieńczeń w bulionie

W szklanych probówkach z bulionem wykonano sześć stężeń alkoholowych roztworów olejku pelargoniowego: 0,025% (0,25 µl/ml), 0,05% (0,5 µl/ml), 0,1% (1,0 µl/ml), 0,25% (2,5 µl/ml), 0,5% (5 µl/ml) oraz 1,0% (10 µl/ml). Każda próba zawierała oprócz podłoża r-r alkoholowy olejek 100 µl zawiesiny bakterii, a cała mieszanina równa była 10 ml. Kontrola (K) składała się z podłoża i zawiesiny bakterii, natomiast kontrola dodatnia (K+) zawierała podłoże, zawiesinę bakterii oraz 100 µl czystego alkoholu. Tak przygotowane próby inkubowano przez 24 godzin w temperaturze 37°C. Po inkubacji, dla każdej z nich wykonano szereg 10-krotnych rozcieńczeń. Następnie na sterylne podłoże Mueller-Hinton agar naniesiono po 100 µl z wybranych rozcieńczeń. Płytki inkubowano 24 godzin w temperaturze 37°C. Po tym czasie obliczono ilość wyrosłych kolonii, a wynik podano w jtk/ml (jtk-jednostkach tworzących kolonie). Metoda ta pozwala na określenie wartości MBC, za którą przyjęto stężenie olejku, przy którym następuje zmniejszenie liczby żywych komórek drobnoustroju o 99,9% w stosunku do próby kontrolnej K+.



## 5. Analiza wyników

Analiza chromatograficzna sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS) wykazała, że badany pelargoniowy olejek eteryczny wykazuje dużą zawartość dwóch najważniejszych związków – cytronelolu i geraniolu. Ilość zarówno jednej jak i drugiej substancji sięgała 24% sumy wszystkich składników. Wykryto również obecność linalolu i izomentonu, które stanowił odpowiednio 6% oraz 4%. Oznaczonych zostało wiele estrów, m.in. mrówczan cytronelolu zajmujący śladową ilość w oleju (<0,05%), a także mrówczan geranylu czy octan geranylu. Obecnych było również wiele monoterpenu, jak nerol, jak i seskwiterpenów.

Analizując aktywność przeciwbakteryjną olejku, stwierdzono że wartość minimalnego stężenia hamującego – MIC dla większości badanych szczepów wyniosła 0,5 µl/ml, natomiast najbardziej wrażliwy na działanie użytego roztworu pelargoniowego olejku eterycznego okazał się szczep *B. megaterium*, dla którego minimalne stężenie hamujące, w badanym zakresie, osiągnięto przy wartości 0,25 µl/ml.

Tabela 1. Metoda seryjnych rozcieńczeń w agarze – wartości minimalnego stężenia hamującego rozwój bakterii MIC

Szczep/ badana próba	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. amylolique- faciens</i>
<b>K</b>	+	+	+	+	+
<b>K+</b>	+	+	+	+	+
<b>0,25 µl/ml</b>	+	-	+	+	+
<b>0,5 µl/ml</b>	-	-	-	-	-
<b>1,0 µl/ml</b>	-	-	-	-	-
<b>2,5 µl/ml</b>	-	-	-	-	-
<b>5,0 µl/ml</b>	-	-	-	-	-
<b>10,0 µl/ml</b>	-	-	-	-	-

„+”- wzrost; „-”- brak wzrostu

Źródło: Opracowanie własne

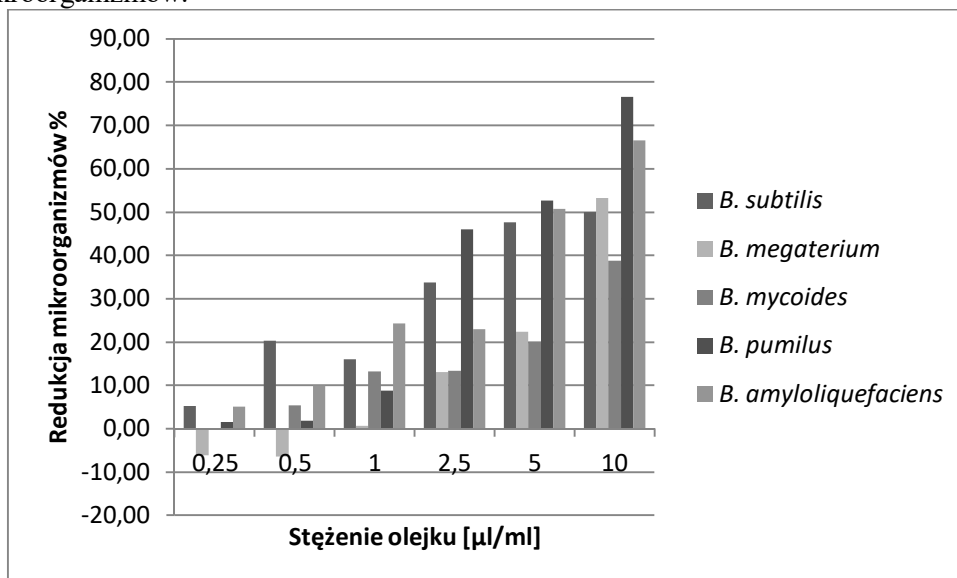
Dla wykorzystanych stężeń etanolowych roztworów pelargoniowego olejku eterycznego nie udało się określić minimalnego stężenia bakterioobójczego (MBC), natomiast jak pokazują dane, przy najwyższym stężeniu badanej substancji 10,0 µl/ml doszło do znacznego zmniejszenia liczby mikroorganizmów – w przypadku *B. subtilis*, *B. mycoides* oraz *B. pumilus* redukcja z  $10^7$  do  $10^4$  [jtk/ml], a dla *B. megaterium* i *B. amyloliquefaciens* – odpowiednio z  $10^6$  oraz  $10^7$  aż do  $10^2$  [jtk/ml].

Tabela 2. Metoda seryjnych rozcieńczeń w bulionie – ilość jednostek tworzących kolonie w 1 ml hodowli [jtk/ml]

Szczep/ Badana próba	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. amylolique- faciens</i>
<b>K</b>	$1,7 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^7$
<b>K+</b>	$1,5 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^5$
<b>0,25 <math>\mu</math>l/ml</b>	$6,1 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^6$	$7,9 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^6$
<b>0,5 <math>\mu</math>l/ml</b>	$3,6 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^7$	$5,7 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^6$
<b>1,0 <math>\mu</math>l/ml</b>	$8,0 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^5$	$7,1 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^5$
<b>2,5 <math>\mu</math>l/ml</b>	$2,8 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5$
<b>5,0 <math>\mu</math>l/ml</b>	$2,0 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^3$
<b>10,0 <math>\mu</math>l/ml</b>	$1,3 \cdot 10^4$	$6,4 \cdot 10^2$	$6,9 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^2$

Źródło: Opracowanie własne

Na poniższym wykresie można zaobserwować, że po zetknięciu się badanych Gram-dodatnich bakterii z niższymi stężeniami roztworów olejku, w wyniku reakcji obronnych i intensywnego namnażania się mikroorganizmów, ich liczba wzrosła. Natomiast w wyższych stężeniach nie obserwowano już tego procesu. Biorąc pod uwagę największą redukcję w liczbie bakterii, najbardziej wrażliwe na działanie pelargonionowego olejku eterycznego były szczepy: *B. pumilus*, *B. subtilis* oraz *B. amyloliquefaciens* – zaobserwowano tutaj największą redukcję w liczbie badanych mikroorganizmów.



Wykres 1. Redukcja mikroorganizmów w kolejnych stężeniach alkoholowego roztworu pelargonionowego olejku eterycznego, Źródło: Opracowanie własne

## 6. Wnioski

Wszystkie badane szczepy *Bacillus* były wrażliwe na hamujące działanie użytego olejku, już przy wprowadzeniu niskich stężeń roztworów olejku osiągnięto wartość MIC.

Dla wykorzystanych stężeń etanolowych roztworów pelargoniowego olejku eterycznego nie udało się określić minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC), natomiast doprowadzono do znacznego zmniejszenia liczby jednostek tworzących kolonie, dlatego przypuszcza się, że niewielkie zwiększenie stężenia roztworu olejku pozwoli na osiągnięcie działania bójczego na wszystkie badane szczepy *Bacillus*. Ta dosyć wysoka oporność jest najprawdopodobniej związana z wytwarzaniem przez te Gram-dodatnie bakterie przetrwalników, przez co są w stanie w pewnym stopniu przeciwstawić się antybakteryjnym właściwościom użytego olejku. Endospory są dla nich „kapsułami ratunkowymi,” gdy w środowisku brak jest pokarmu lub gdy w otoczeniu pojawia się czynnik toksyczny, jak np. badany destylat. Najbardziej wrażliwe na działanie pelargoniowego olejku eterycznego były szczepy: *B. pumilus*, *B. subtilis* oraz *B. amyloliquefaciens* – doszło tutaj do największej redukcji liczby badanych mikroorganizmów. Przypuszcza się, że wysoka zawartość cytronelolu i geraniolu w największej mierze przyczyniła się do wykazanych antybakteryjnych właściwości badanego destylatu z *Pelargonium graveolens*.

## Literatura

1. Tongnuanchan P., Benjakul S., *Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation*, Journal of Food Science, 79, (2014), s. 1231-1249.
2. Król S.K., Skalicka-Woźniak K., Kandefor-Szerszeń M., Stepulak A., *Aktywność biologiczna i farmakologiczna olejków eterycznych w leczeniu i profilaktyce chorób infekcyjnych*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 67, (2013), s. 1000-1007.
3. Bigos M., Wasieła M., Kalemba D., Sienkiewicz M., *Antimicrobial activity of geranium oil against clinical strains of Staphylococcus aureus*, Molecules, 17, (2012), s. 10276-10291.
4. Michalski J.A., Zielińska D., *Przegląd olejków eterycznych pozyskiwanych z roślin z rodziny jasnотowatych (Lamiaceae) i ich własności*, Polish Journal of Cosmetology, 12, (2015), s. 16-24.
5. Blerot B., Baudino S., Prunier C., Demarne F., Toulemonde B., Caissard J.C., *Botany, agronomy and biotechnology of Pelargonium used for essential oil production*, Phytochemistry Reviews, 15, (2016), s. 935-960.
6. Juliani H.R., Koroch A., Simon J.E., Hitimana N., Daka A., Ranarivelo L., Langenhoven P., *Quality of geranium oils (Pelargonium species): case studies in Southern and Eastern Africa*, Journal of Essential Oil Research, 18, (2006), s. 116-121.
7. Verma R.S., Verma R.K., Yadav A.K., Chauhan A., *Changes in the essential oil composition of rose-scented geranium (Pelargonium graveolens L'Herit. ex Ait.) due to date of transplanting under hill conditions of Uttarakhand*, Indian Journal of Natural Products and Resources, 1, (2010), s. 367-370.
8. Džamić A.M., Soković M.D., Ristić M.S., Grujić S.M., Mileski K.S. Marin P.D., *Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of Pelargonium graveolens essential oil*, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 4, (2014), s. 1-5.
9. Sharopov F.S., Zhang H., Setzer W.N., *Composition of geranium (Pelargonium graveolens) essential oil from Tajikistan*, American Journal of Essential Oils and Natural Products, 2, (2014), s. 13-16.

10. Nejad A.R., Ismaili A., *Changes in growth, essential oil yield and composition of geranium (Pelargonium graveolens L.) as affected by growing media*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 94, (2013), s. 905-910.
11. Bednarczyk A., Daczowska-Kozon E.G., *Czynności patogenności bakterii z grupy Bacillus cereus*, Postępy Mikrobiologii, 47, (2008), s. 51-63.
12. Kozajda A., Szadkowska-Stańczyk I., *Bakterie Bacillus subtilis jako problem legislacyjny higieny pracy w Polsce*, Medycyna Pracy, 63, (2012), s. 91-96.
13. Pietraszek P., Walczak P., *Charakterystyka i możliwości zastosowania bakterii z rodzaju Bacillus wyizolowanych z gleby*, Polish Journal of Agronomy, 16, (2014), s. 37-44.
14. Olesiak P., Stępnia L., *Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych wobec przetrwalników Bacillus*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 15, (2012), s. 41-50.
15. Maurya S., Kushwaha A.K., Singh G., *Biological significance of spicy essential oils*, Advances in Natural Science, 6, (2013), s. 84-95.

## Działanie pelargonioowego olejku eterycznego na *Bacillus* spp.

### Streszczenie

Pelargonia pachnąca (*Pelargonium graveolens*) jest aromatycznym krzewem posiadającym jasnozielone, owłosione, miękkie w dotyku, karbowane liście i małe, różowe kwiaty. Należy do rodzaju *Pelargonium* (*Geraniaceae*) i liczy ponad 250 gatunków. Olejek eteryczny pozyskiwany z pelargonii jest bardzo ceniony nie tylko przez przemysł perfumeryjny czy aromaterapię, ale także przez przemysł spożywczy, kosmetyczny jak i farmację. Roczną produkcję olejku szacuje się na 300 ton. Liczne badania wskazują na jego silne właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwbólowe czy przeciwzapalne. Celem przeprowadzonych badań było określenie aktywności olejku pelargonioowego wobec *Bacillus* spp. Zebrano jednoroczne liście pelargonii, a następnie świeży materiał umieszczono w aparacie Clevengera i poddano 3-godzinnej hydrodestylacji. Gotowym olejkiem działano na pięć szczepów *Bacillus* wyizolowanych ze środowiska oraz z psującej się żywności: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pumilus* oraz *B. amyloliquefaciens*. Dla wykorzystanych stężeń olejków nie udało się określić minimalnego stężenia bakteriobójcze (MBC), natomiast poznano wartości minimalnego stężenia olejku hamującego wzrost ww. szczepów (MIC).

Wyniki potwierdziły aktywność olejku wobec badanych szczepów *Bacillus* spp., co stanowi przesłankę, jakoby substancja ta mogłaby być stosowana jako konserwant naturalny w żywności.

Słowa kluczowe: pelargonioowy olejek eteryczny, *Pelargonium graveolens*, *Bacillus* spp.

## Antimicrobial activity of pelargonium essential oil on *Bacillus* spp.

### Abstract

*Pelargonium graveolens* is an aromatic shrub with soft to the touch, carved leaves, and small, pink flowers. Genus *Pelargonium* belongs to *Geraniaceae* family and contains more than 250 species. Essential oil from *P. graveolens* is very valuable not only for perfumery, aromatherapy, food and beverages industry, but also for pharmaceutical industry. The annual production of pelargonium essential oil is up to 300 tons. Numerous researches show antibacterial, antiviral, analgesic and anti-inflammatory properties of the essential oil.

The aim of this study was to confirm the antimicrobial properties of essential oil that was freshly hydrodistilled from indoor cultivation of *Pelargonium graveolens* on *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pumilus* and *B. amyloliquefaciens*. Bacterial strains were obtained from the soil and spoiled food. The concentrations of pelargonium oil dissolved in ethanol was not enough to establish minimum bactericidal concentration (MBC), but a minimum inhibitory concentration (MIC) of pelargonium essential oil was calculated.

The outcomes of this research confirmed antimicrobial properties of studied essential oil and showed that it could be used as a natural preservative in food.

Keywords: pelargonium essential oil, *Pelargonium graveolens*, *Bacillus* spp.

# Przegląd metod produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu

## 1. Wstęp

Piwo jest napojem alkoholowym znanym ludzkości od czasów starożytnych. Najstarsze znaleziska archeologiczne potwierdzające produkcję piwa datuje się na blisko 4000 lat p.n.e. i pochodzą one z kultury Sumerów. Poza wspomnianymi Sumerami piwowarstwem trudnili się również Egipcjanie i Babilończycy, z czego ci ostatni jako pierwsi zastosowali chmiel w procesie produkcji. W czasach rozkwitu kultury starożytnej Grecji i Rzymu piwo było nie cieszyło się dużym zainteresowaniem, lecz nie zostało zapomniane. Swoją największą popularność, w tamtych czasach, omawiany trunek miał głównie na północ od basenu Morza Śródziemnego. Dopiero w Średniowieczu za sprawą klasztorów, a później również miejskich browarów, piwo wróciło do łask. Natomiast od XVIII wieku browarnictwo zaczęło się szybko rozwijać, głównie za sprawą naukowców, którzy zaczęli bliżej przyglądać się tej znanej od wieków, choć słabo zbadanej, gałęzi przemysłu spożywczego [1]. Rozwój ten trwa do dnia dzisiejszego, co wynika z coraz to bardziej wyrafinowanych potrzeb konsumentów. Jedną z nich było stworzenie piwa bezalkoholowego, które łączyłoby w sobie smak swoich alkoholowych odpowiedników jednocześnie posiadając zmniejszony poziom etanolu w swoim składzie. Aby to osiągnąć opracowano szereg metod zarówno fizycznych jak i biologicznych mających na celu dostarczenie produktu o obniżonej zawartości alkoholu. Celem niniejszej pracy jest scharakteryzowanie i omówienie wspomnianych sposobów produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu oraz próba wskazania metody pozwalającej najskuteczniej zmniejszyć zawartość etanolu w gotowym produkcie.

## 2. Piwo bezalkoholowe i wymagania mu stawiane

Piwo bezalkoholowe, a dokładniej piwo o obniżonej zawartości alkoholu, to napój produkowany na bazie piwa, w którym wskutek procesów technologicznych zmniejszono zawartość etanolu do akceptowalnych przez konsumenta granic. Prawodawstwo poszczególnych krajów nie jest jednolite w sprawie zawartości alkoholu w piwach bezalkoholowych. Nawet w krajach Unii Europejskiej rozpiętość zakresu piw bezalkoholowych jest całkiem spora. Przykładowo, w Polsce piwo bezalkoholowe nie może mieć więcej niż 0,5% obj. alkoholu [2]. Takie same kryteria obowiązują w Niemczech i Wielkiej Brytanii. Natomiast w Norwegii dopuszczalna

---

<sup>1</sup> mateusz.jackowski@pwr.edu.pl Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska.

<sup>2</sup> magdalena.lech@pwr.edu.pl Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska.

<sup>3</sup> anna.trusek-holownia@pwr.edu.pl Zakład Inżynierii Bioprocessowej i Biomedycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Wroclawska.

wartość to 0,7%, za to w Hiszpanii wspomniana wartość wynosi już 1%, zaś we Francji 1,2% obj. alkoholu [3].

Piwo to nie tylko alkohol. W omawianym trunku znajduje się szereg substancji wykazujących działanie przeciwbakteryjne, antyoksydacyjne oraz hamujące rozwój osteoporozy, jak i niektórych chorób neurodegeneracyjnych. Dodatkowo w piwie zawarte są witaminy z grupy B w przypadku, których napój ten pokrywa znaczną część dziennego zapotrzebowania na te związki. Przykładowo, litr piwa zapewnia ok. 50% dziennego zapotrzebowania na niacynę, czyli witaminę B<sub>3</sub> [3, 4].

Duża część ze składników piwa decydujących o jego właściwościach organoleptycznych i prozdrowotnych pochodzi z chmielu. To właśnie chmiel odpowiada za goryczkę piwa, charakterystyczny aromat, ma wpływ na tworzenie się i stabilność piany. Ponadto wspomnianej roślinie z rodziny konopiowatych zawdzięczamy bakteriostatyczne właściwości piwa [5]. Największym wyzwaniem podczas produkcji piw bezalkoholowych jest pozbawienie napoju alkoholu bez utraty związków odpowiedzialnych za charakterystyczne cechy organoleptyczne piwa, w szczególności są to właśnie związki pochodzące z chmielu.

### **3. Fizyczne metody produkcji piwa bezalkoholowego**

Opisane poniżej metody dotyczą sytuacji, w której piwo produkowane jest klasyczną metodą, a po procesie etanol jest usuwany w wybranych procesach membranowych czy termicznych.

#### **3.1. Dializa**

Dializa polega na rozdzieleniu rozpuszczonych w piwie cząsteczek ze względu na ich rozmiar. Separacja odbywa się na półprzepuszczalnej membranie zaś siłą napędową procesu jest gradient stężeń rozpuszczonych składników w poprzek wspomnianej membrany. Pomimo, że w dializie standardowo nie stosuje się podwyższonego ciśnienia, to w przypadku piwa stosuje się drobne odstępstwo od tej zasady. A mianowicie wprowadza się pod ciśnieniem dwutlenek węgla, który ma zapobiec wydzielaniu się tego związku zawartego w przerabianym piwie, co z kolei mogłoby niekorzystnie wpłynąć na proces dyfuzji składników rozpuszczonych w piwie przez membranę. Największą zaletą dializy jest możliwość stosowania niskiej temperatury w tej metodzie, co zapobiega rozkładowi termicznemu związków m.in. tych odpowiadających za cechy organoleptyczne piwa. Jak pokazały badania [3] niestety w toku procesu poza etanolem usuwane są również wyższe alkohole i estry mające wpływ na aromat piwa. Natomiast większość związków pochodzących z chmielu, w tym te odpowiedzialne za goryczkę i część aromatu pozostaje w piwie i nie dyfunduje przez membranę ze względu na ich dużą masę cząsteczkową. Stopień dealkoholizacji można zmieniać regulując tempo odbioru dializatu. Niestety mimo to, bardzo ciężko jest usunąć 90% etanolu z piwa, aby uzyskać napój o zawartości alkoholu nieprzekraczającej 0,5% obj. [3, 6, 7].

#### **3.2. Odwrócona osmoza**

Odwrócona osmoza jest procesem, w którym wymuszamy przepływ rozpuszczalnika ze środowiska mniej stężonego do bardziej stężonego. Wspomniane środowiska rozdzielone są selektywną membraną o porach średnicy kilku mikrometrów. Przepływ wymusza się poprzez przyłożenie podwyższonego ciśnienia sięgającego nawet 60 barów od strony bardziej stężonego roztworu, czyli w omawianym

przypadku piwa, zaś przepływ odbywa się w kierunku środowiska wodnego, czyli tego o mniejszym stężeniu etanolu. Stosowane membrany powinny być wysoce przepuszczalne dla etanolu i wody jednocześnie będąc nieprzepuszczalne dla reszty związków decydujących o cechach organoleptycznych piwa. Ponadto materiały, z których wykonuje się półprzepuszczalne bariery powinny cechować się dobrą wytrzymałością mechaniczną, być odporne na zatykanie oraz na środki stosowane do dezynfekcji sprzętów stosowanych w przemyśle spożywczym.

Jak pokazały badania w procesie odwróconej osmozy z piwa usuwany jest etanol, woda oraz niektóre niekorzystne związki chemiczne takie jak siarczek dimetylu, który w zbyt dużych stężeniach odpowiada za aromat gotowanych warzyw w niektórych wadliwie uwarzonych piwach. Niestety poza wspomnianymi związkami w procesie odwróconej osmozy usunięciu ulegają również niektóre estry i wyższe alkohole. Po zakończonym procesie do retentatu trzeba dodać wodę, aby uzupełnić straty wynikające z mechanizmu odwróconej osmozy. Jedną z interesujących metod jest wykorzystanie do tego celu permeatu po odparowaniu etanolu. Wskutek tego zabiegu do retentatu wraca nie tylko woda ale również część związków, które zostały usunięte w toku trwania procesu. Niestety, jak do tej pory, proces odwróconej osmozy jest niekorzystny z ekonomicznego punktu widzenia i najprawdopodobniej w najbliższym czasie nie będzie stosowany na skalę przemysłową [3, 7, 8].

### **3.3. Perwaporacja**

Perwaporacja jest to technika, które wiąże ze sobą trzy mechanizmy separacji: adsorpcji separowanego składnika na membranie, jego dyfuzję przez materiał membrany oraz desorpcję. Ostatni etap wiąże się z pracą pod obniżonym ciśnieniem a tym samym odbiorem permeatu w formie gazowej. Zdolność danego składnika (w tym przypadku etanolu) do przechodzenia przez membranę perwaporacyjną jest ściśle związana z jego ciśnieniem cząstkowym oraz selektywnością membrany [1].

Z racji faktu, że jest to proces wykorzystujący właściwości lotne separowanych składników, poza samym alkoholem do permeatu mogą przechodzić inne, często wpływające na odpowiednią jakość piwa aromaty. Badania prowadzone do tej pory nie były satysfakcjonujące, co wynikało przede wszystkim z faktu braku odpowiedniej selektywności membrany. W przypadku gdy stężenie alkoholu zostaje zredukowane o ponad połowę (z 5% do 2,6%) niemal 88% wyższych alkoholi oraz estrów znajduje się wraz z alkoholem w permeacie, a dalsza redukcja stężenia alkoholu (do 0,6%) powoduje, że w piwie zostaje jedynie 3,4% wszystkich wspomnianych aromatów [2, 3]. Z tego też powodu, proces ten może być również wykorzystywany do odzysku cennych aromatów i późniejszego kontrolowanego wzbogacania o nie piwa bezalkoholowego [4].

### **3.4. Odparowanie alkoholu i rektyfikacja**

Zupełnie odmiennymi technikami usuwania alkoholu z piwa są metody termiczne polegające na podgrzaniu układu do temperatury, która spowoduje odparowanie danych składników. Rozdział bazuje na różnicach w lotności składników układu.

Odparowanie prowadzone jest w wyparkach z tzw. spadającym filmem. Najpopularniejszym wykorzystaniem tego typu wyparek jest zagęszczanie produktów spożywczych: soków, napojów mlecznych czy syropów, jednak po doborze odpo-

wiedniej temperatury procesowej, mogą posłużyć do odparowania alkoholu w piwie. Im wyższa temperatura tym większy stopień redukcji alkoholu, ale jednocześnie większa strata cennych związków aromatycznych, np. przy redukcji zawartości etanolu z poziomu 5,0% do 0,5% v/v stężenie wyższych alifatycznych alkoholi stanowi jedyne 6% w stosunku do początkowej ilości, natomiast związki ogólnie niekorzystnie wpływające na smak produktu takie jak: siarczek dimetylu czy diacetyl po procesie są praktycznie nieobecne w piwie [1].

Bardziej kontrolowane odparowanie piwa, prowadzące do pewnego rodzaju rozfrakcjonowania alkoholu i aromatów ma miejsce na kolumnach rektyfikacyjnych (na których dochodzi do wielokrotnego odparowania i skraplania). Niewątpliwą zaletą tego procesu jest możliwość odebrania jedynie frakcji alkoholowej oraz frakcji zawierającej tylko pewną grupę składników. Należy jednak pamiętać, że przed rektyfikacją należy od piwa odseparować CO<sub>2</sub>, co powoduje już wstępne usunięcie cennych aromatów [2].

#### **4. Biologiczne metody produkcji piwa bezalkoholowego**

Poniższe metody dotyczą zmiany przy wytwarzaniu piwa zarówno od strony samych procedur, jak i doboru szczepów fermentujących.

##### **4.1. Zmiana sposobu zacierania**

Zacieranie to najważniejszy etap w procesie produkcji piwa, gdyż właśnie wtedy alfa i beta amylazy zawarte w słodzie rozkładają skrobię zawartą w ziarnach. W ten sposób powstają cukry proste będące surowcem dla drożdży do przeprowadzenia fermentacji alkoholowej. Podczas zacierania dokonuje się zmian temperatury zacieru, aby zapewnić odpowiednie warunki dla pracy poszczególnych enzymów amylolitycznych. Przykładowo dla beta amylaz optymalna temperatura wynosi 62-65°C, zaś dla alfa amylaz 72-75°C.

Jedną z metod obniżania poziomu alkoholu jest zacieranie w wysokiej temperaturze 75-80°C. Wtedy beta amylazy ulegają dezaktywacji, zaś alfa amylazy nadal wykazują część swojej aktywności. Dzięki takiemu zabiegowi ilość cukrów fermentowalnych przez drożdże spada do około 25% w porównaniu do tradycyjnego zacierania.

Drugie podejście do zmniejszenia ilości cukru w brzeczce wynika także z obniżenia aktywności enzymatycznej, ale z kolei poprzez obniżenie temperatury poniżej 60°C. Niższa aktywność enzymów skutkuje niewielką zawartością fermentowalnych cukrów w brzeczce.

Kolejną metodą polegającą na zmianach w procesie zacierania jest ponowne zacieranie wysłodzin nierzadko poprzedzone kwaśną hydrolizą w celu uwolnienia pozostałych cukrów, głównie niefermentowalnych pentoz.

Powyższe metody mogą skutkować powstaniem wad organoleptycznych piwa. W przypadku zacierania w niższej temperaturze lub zacierania wysłodzin mogą to być problemy z uzyskaniem odpowiedniej barwy. Natomiast w przypadku zacierania w niższej oraz wyższej temperaturze od optymalnej należy liczyć się ze słodkawym smakiem gotowego produktu [15, 16].



## 4.2. Zatrzymana fermentacja

Zatrzymana fermentacja to obecnie najczęściej wykorzystywana metoda produkcji piwa bezalkoholowego. Idea tego procesu polega na tym, żeby zatrzymać proces fermentacji alkoholowej zanim drożdże piwowskie zaczną produkować etanol. W tym celu fermentujące piwo można poddać pasteryzacji, można je również szybko ochłodzić do temperatury 0°C albo odwirować drożdże. Niestety przez to, że część cukrów nie uległa fermentacji w tak otrzymanym produkcie można wyczuć charakterystyczny słodowy smak. Częściowo można poprawić walory smakowe tak uzyskanego produktu poprzez leżakowanie w kadzi przez około 10 dni.

Drugim podobnym podejściem do problemu jest stworzenie takich warunków, w których drożdże będą wytwarzały etanol w mniejszych ilościach. Najpopularniejszą metodą na stworzenie takich warunków jest tak zwany proces zimnego kontaktu (*cold contact process* – proces zwany w skrócie jako CCP). CCP polega na tym, że fermentację prowadzi się w temperaturze 1°C przy zakwaszeniu brzezki do pH 4 za pomocą kwasu mlekowego. W takich warunkach fermentacja alkoholowa zachodzi wolniej, zaś proces tworzenia wyższych alkoholi jak i estrów ulega znacznie mniejszemu spowolnieniu niż wytwarzanie etanolu. Mimo wytwarzania większej ilości związków aromatycznych piwo uzyskane w procesie zimnego kontaktu posiada analogiczny słodowy smak jak piwo wytworzone przez zatrzymanie fermentacji.

Istnieje kilka sposobów polepszania walorów smakowych takiego produktu. Jednym z nich jest zwiększenie udziału ciemnych sładów w zasypie, które maskują słodowy smak. Podobny efekt w postaci maskowania niepożądanego smaku daje użycie około 5% sładów zakwaszającego (obniżającego pH brzezki) w zasypie podczas zacierania. Kolejnym sposobem jest rozcieńczenie brzezki po procesie gotowania zamiast przed gotowaniem, jak to robi się tradycyjnie. Skutkuje to uzyskaniem bogatszego bukietu estrów i wyższych alkoholi. Zaletą obydwu omawianych metod jest to, że można je stosować w tradycyjnych browarach i nie trzeba rozbudowywać już istniejących instalacji o dodatkowe komponenty [7, 15, 17].

## 4.3. Ciągła fermentacja

Ciągła fermentacja to proces polegający na przepływie brzezki przez złożę z immobilizowanymi drożdżami. Immobilizacji najczęściej dokonuje się na DEAE-celulozie, wiórach drzewnych jak i na wysłodzinach przede wszystkim ze względu na ich niską cenę. Sam proces niesie ze sobą pewne trudności, gdyż trzeba dobrać nośnik do immobilizacji, jak i dobrać parametry przepływu brzezki. Zazwyczaj zakładają one kontakt brzezki z immobilizowanym złożem w przedziale od 1 do 12 godzin. Ponadto w celu właściwego tworzenia się estrów i wyższych alkoholi należy zadbać o delikatne napowietrzanie złoża. Dodatkowo pozytywnie na proces wpływa immobilizowanie bakterii kwasu mlekowego przed immobilizowanymi drożdżami, co zapewnia delikatne zakwaszenie brzezki, co z kolei powoduje zwiększone tworzenie wyższych alkoholi i estrów odpowiadających za aromat gotowego piwa bezalkoholowego. Badania wykazały, że piwo bezalkoholowe uzyskiwane metodą ciągłej fermentacji nie odstaje pod względem walorów smakowych od komercyjnie produkowanych piw bezalkoholowych. Na chwilę obecną nie funkcjonują żadne przemysłowe instalacje wykorzystujące metodę ciągłej fermentacji, gdyż wymagałoby to budowy nowej linii produkcyjnej, która niosłaby znaczne trudności w kontrolowaniu parametrów wpływających na proces [18, 19].

#### 4.4. Specjalne szczepy drożdży

W przedstawionych wcześniej metodach próbowano podejść do zagadnienia produkcji piw bezalkoholowych poprzez usunięcie alkoholu lub poprzez ograniczenie możliwości fermentacji cukrów przez drożdże. Ostatnim sposobem jest ingerencja w sam biokatalizator. Proces taki jest prosty do wykonania, gdyż wszystkie procedury są takie same jak w przypadku tradycyjnego piwa z tym, że do fermentora wprowadza się inny typ mikroorganizmów produkujących mniejsze ilości etanolu. Niestety ze względu na tą właściwość w tak prowadzonym procesie może łatwiej dojść do zakażenia mikrobiologicznego fermentującego piwa dlatego też trzeba zachować bardziej restrykcyjne normy sanitarne.

Jednym ze stosowanych gatunków drożdży są *Saccharomyces ludwigii*, które nie potrafią fermentować maltozy ani maltotrioz. Jednym z mankamentów piwa o obniżonej zawartości alkoholu otrzymanego przy użyciu wspomnianego szczepu jest słodkawy smak otrzymanego produktu wynikający z nieprzefermentowanych cukrów obecnych w piwie. Kolejnym rozpatrywanym szczepem pod kątem produkcji piw bezalkoholowych jest *Saccharomyces rouxii*. Ten mikroorganizm ma interesującą cechę polegającą na rozkładaniu etanolu w warunkach tlenowych. Niestety napowietrzanie może negatywnie wpłynąć na pozostałe substancje odpowiadające na cechy organoleptyczne piwa.

W 2005 roku została opatentowana metoda produkcji napoju podobnego do piwa wykorzystująca grzyby z rodzaju *Monascus*. Według autorów w toku procesu powstaje czerwony, orzeźwiający napój o niewielkiej zawartości alkoholu. Niemniej nie wiadomo czy ten produkt można klasyfikować jako piwo czy też jako inny typ napoju.

Poza naturalnie występującymi mikroorganizmami uwaga piwowarów skierowała się w kierunku organizmów modyfikowanych genetycznie. Najczęściej drożdże *Saccharomyces cerevisiae* poddaje się ekspozycji na światło ultrafioletowe a następnie selekjonuje się mutanty z nieaktywnymi genami kodującymi dehydrogenazę 2-ketoglutaranu oraz fumarazę. Enzymy te wchodzące w skład cyklu Krebsa mają pośredni wpływ na tworzenie etanolu w toku fermentacji. Mutacje w drożdżach można też wprowadzić metodami inżynierii genetycznej niemniej mimo podobnych efektów do promieniowania UV tego sposób jest mniej akceptowany przez potencjalnego konsumenta [15, 20-23].

#### 5. Podsumowanie

Piwo to napój towarzyszący ludzkości od tysiącleci. W toku rozwoju cywilizacji ten produkt spożywczy przeszedł swoistą ewolucję od prostych napojów powstających na drodze spontanicznej fermentacji aż do najbardziej wyszukanych piw dostępnych obecnie na rynku. Obecnie w krajach rozwiniętych można zauważyć tendencję do ograniczania spożywanego alkoholu. Piwo bezalkoholowe jest alternatywą dla osób stosujących farmakoterapię niepozwalającą na picie napojów alkoholowych oraz dla sportowców traktujących piwo jako naturalny płyn izotoniczny.

Większość dużych browarów ma w swojej ofercie już bezalkoholowe odpowiedniki tradycyjnych piw, które tylko po części jakościowo odpowiadają klasycznym piwom.

Przedstawione powyżej metody na pozyskanie dobrego jakościowo piwa bezalkoholowego nie dają jednoznacznej metody. Wydaje się, że rozwiązaniem jest zastosowanie zarówno odpowiedniego szczepu fermentującego, dobranie dla niego warunków procesowych na poziomie fermentacji, skierowanie zacieru tylko częściowo zhydrolizowanego a po zakończonym procesie odbiór alkoholu np. poprzez odparowanie.

## Literatura

1. Wiśniewski P., *Piwa historie niezwykle*. Warszawa: Print Shops PREGO – Polska, 1993
2. Art. 94 pkt 1 Ustawy o podatku akcyzowym (Dz.U. z 2017 r. poz. 43).
3. Muller M., Bellut K., Tippmann J., Becker T., *Physical Methods for Dealcoholization of Beverage Matrices and their Impact on Quality Attributes* ChemBioEng Rev 2017, 4, No. 5, s. 310-326.
4. Bamforth C.W., *Nutritional aspects of beer – a review* Nutrition Research 22 (2002) s. 227-237
5. Almaguer C., Schönberger C., Gastl M., Arendt E.K. Becker T. *Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review*. J. Inst. Brew. 2014; 120, s. 289-314
6. Donhauser, S., Glas, K., Mueller, O., *Behavior of beer components during the manufacture of alcohol-reduced products by dialysis*. Brauwelt International, 1991, 2, s. 139-144.
7. Branyik, T., Silva, D.P., Baszczynski, M., Lehnert, R., Almeida e Silva, J.B. *A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production* Journal of Food Engineering 108 (2012), s. 493-506.
8. Catarino, M., Mendes, A., Madeira, L.M., Ferreira, A., *Alcohol removal from beer by reverse osmosis*. Separation Science and Technology 42 (2007), s. 3011-3027.
9. Rautenbach R., *Procesy membranowe – podstawy projektowania modułów i instalacji*, Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1996
10. Catarino M., Ferreira A., Mendes A, *Study and optimization of aroma recovery from beer by pervaporation*, J. Membr. Sci. 2009, 341 (1-2), s. 51-59
11. Pollock, D., Diploma Thesis, Technical University Munich 1990.
12. Catarino, M., Mendes, A., *Non-alcoholic beer – a new industrial process*. Sep. Purif. Techn., 2011 79 (3), s. 342-351.
13. Zufall C., Wackerbauer K., *Verfahrenstechnische parameter bei der entalkoholisierung von bier mittels fallstromverdampfung und ihr einfluß auf die bierqualität*, Monatsschr. Brauwiss. 2000, 7/8, s. 124-137.
14. [http://ethanolresearch.com/pdf/Corn-to-Ethanol\\_Process\\_-\\_sab.pptx](http://ethanolresearch.com/pdf/Corn-to-Ethanol_Process_-_sab.pptx) [dostęp 25.03.2018]
15. Muller, R., *The production of low-alcohol and alcohol-free beers by limited fermentations*. Ferment 3 (4) (1990), s. 224-230.
16. Muller, R.E., *The effects of mashing temperature and mash thickness on wort carbohydrate composition*. Journal of the Institute of Brewing 97, (1991), s. 85-92.
17. Narziss, L., Miedaner, H., Kern, E., Leibhard, M., *Technology and composition of non-alcoholic beers. Processes using arrested fermentation*. Brauwelt International 4, (1992) s. 396-410.
18. Lehnert, R., Novak, P., Macieira, F., Kurec, M., Teixeira, J.A., Branyik, T., *Optimisation of lab-scale continuous alcohol-free beer production*. Czech Journal of Food Sciences 27 (4) (2009), s. 267-275.

19. Mota, A., Novak, P., Macieira, F., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Šmogrovicova, D., Branyik, T., *Formation of flavor active compounds during continuous alcohol-free beer production: the influence of yeast strain, reactor configuration and carrier type*. Journal of the American Society of Brewing Chemists 69 (1) (2011), s. 1-7.
20. Attenborough, W.M., *Evaluation of processes for the production of low- and non-alcohol beer*. Ferment 1 (2) (1988), s. 40-44.
21. Dziondziak, K., *Method for the production of alcohol-free beer*. (1989) US Patent 4882, s. 177.
22. Lin, T.F., Chen, Y.L., Wang, T.H., *Method for producing beer-like and alcoholfree fermented beverage*. (2005) UK Patent Application GB 2414486 A.
23. Narvatil, M., Domeny, Z., Šturdik, E., Šmogrovicova, D., Gemeiner, P., *Production of non-alcoholic beer using free and immobilized cells of Saccharomyces cerevisiae deficient in the tricarboxylic acid cycle*. Biotechnology and Applied Biochemistry 35 (2) (2002), s. 133-140.

## Przegląd metod produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu

### Streszczenie

Celem prezentowanej pracy jest omówienie i porównanie metod produkcji piwa o obniżonej zawartości alkoholu zarówno obecnie stosowanymi metodami jak i nowymi sposobami podejścia do tego problemu. W szczególności omówieniu poddano najpopularniejszą i zarazem najczęściej stosowaną w przemyśle metodę zmniejszania zawartości etanolu w gotowym produkcie polegającą na zatrzymaniu fermentacji przed wytworzeniem wspomnianego alkoholu przez drożdże piwowarskie. Niemniej przybliżono również szerokie spektrum metod zarówno fizycznych jak i biologicznych. Do tych pierwszych zaliczono procesy termiczne oraz membranowe takie jak odwrócona osmoza, dializa, destylacja i rektyfikacja. Natomiast do drugiej grupy przyporządkowano takie procesy jak ciągła fermentacja, zmiana sposobu zacierania oraz stosowanie specjalnych szczepów drożdży. W porównaniu największą wagę przywiązano do wpływu omawianych metod produkcji piwa na zawartość poszczególnych związków chemicznych odpowiadających za cechy organoleptyczne produktu, w szczególności za smak i zapach.

Słowa kluczowe: piwo bezalkoholowe, usuwanie etanolu; optymalizacja fermentacji; kontrola zacierania.

## Non-alcoholic beer production – an overview

### Abstract

The target of the paper is to compare different methods of non-alcoholic beer production including ubiquitous ones and new approaches to this problem. The main focus is concentrated on the most widely applied method of non-alcoholic beer production called limited fermentation. The target of this method is to stop fermentation before brewing yeasts start to produce ethanol. Furthermore a wide overview on biological and physical methods was presented. Physical approaches include thermal and membrane processes like reverse osmosis, dialysis, distillation and rectification. Presented biological methods are continuous fermentation, special yeast types selection and changed mashing regime. In this comparison the main target is to determine how presented methods correlate with the concentration of compounds responsible for characteristic taste and flavour of a beer.

Keywords: non-alcoholic beer, ethanol separation; fermentation optimizing; mashing control.

## Aktywność przeciwgrzybicza 2-(4-fluorofenyloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)- -1,3,4-tiadiazolu (FABT)

### 1. Wstęp

Liczne artykuły naukowe donoszą, że zachorowalność i śmiertelność wywołana infekcjami grzybiczymi w ostatnich latach znacząco wzrasta. Zjawisko to spowodowane jest przede wszystkim stale zwiększającą się liczbą pacjentów leczonych immunosupresyjnie po przeszczepach narządów lub szpiku kostnego oraz w chorobach autoimmunologicznych [1, 2]. Czynnikiem sprzyjającym pojawieniu się inwazyjnej grzybicy układowej jest także osłabienie układu odpornościowego spowodowane chemioterapią, intensywną antybiotykoterapią oraz pierwotnym lub wtórnym niedoborem odporności [3].

Częstym problemem, są także grzybice powierzchniowe obejmujące skórę, paznokcie i błony śluzowe, występujące szczególnie u dzieci i chorych na astmę przyjmujących wziewne sterydy. Badania pacjentów po przeszczepach narządów wykazały, że zagrażające życiu grzybice układowe są najczęściej wywołane przez szczepy z rodzaju *Candida* (53%), *Aspergillus* (19%), *Cryptococcus* (8%), a także pleśnie inne niż *Aspergillus* (8%) i grzyby endemiczne (5%) [4]. Niepokojącym zjawiskiem jest coraz częstsze występowanie inwazyjnych aspergilloz, w przypadku których rokowania są gorsze niż w przypadku kandydoz oraz infekcji spowodowanych szczepami *Candida* innymi niż *albicans*, które często wykazują zmniejszoną wrażliwość na polieny i oporność na azole [5, 6]. Do listy oportunistycznych patogenów grzybowych wciąż dodawane są nowe organizmy, takie jak np. *Basidiomycetes* (rodzaje *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*), *Zygomycetes* (*Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*, *Cunninghamella spp.*), *Sordariomycetes* (*Fusarium spp.*), czy grzyby melanizujące [6, 7]. Grzyby są organizmami wszechobecnymi w środowisku, szacuje się, że wraz z każdym oddechem do organizmu człowieka dostaje się aż do 10 spor grzybowych [8]. Coraz częściej organizmy grzybowe są uznawane za istotny składnik ludzkiego mikrobiomu, a ich dysbioza prowadzi do szeregu groźnych chorób [9, 10]. Obecnie medycyna dysponuje kilkoma klasami leków przeciwgrzybiczych, takich jak polieny (oddziałujące z zawartym w błonie komórkowej ergosterolem), azole (blokujące szlak syntezy ergosterolu), echinokandyny (hamujące syntezę składników ściany komórkowej), oraz pochodne

<sup>1</sup> katarzynabonio@gmail.com, Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, www.umcs.pl.

<sup>2</sup> Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, www.umcs.pl.

<sup>3</sup> Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

<sup>4</sup> Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej w Lublinie, www.umcs.pl.

flucytozyny (będące toksycznymi analogami pirymidyny). Spośród leków z grupy polienów, najdłużej stosowanym i najskuteczniejszym antybiotykiem jest amfoterycyna B (AmB) używana jako pierwsza linia obrony w ciężkich, zagrażających życiu mykozach systemowych [11]. Pomimo długiego okresu stosowania AmB, rzadko pojawiają się szczepy z nabytą opornością na ten antybiotyk. Jednak leczenie obecnie dostępnymi preparatami na bazie AmB, związane jest z poważnymi skutkami ubocznymi, a zwłaszcza z nefrotoksycznością i hepatotoksycznością. Z kolei najczęściej stosowane leki z grupy azoli, takie jak flukonazol, itraconazol, worykonazol czy posakonazol, wykazują działanie grzybobójcze, indukując dość często oporność i wykazują wybiórczą aktywność w stosunku do patogenów grzybowych [12]. Leki takie jak, 5-fluorocytozyna czy flucytozyna, które osłabiają syntezę kwasów nukleinowych, powodują szybkie narastanie oporności i powinny być stosowane w skojarzeniu z innymi lekami przeciwgrzybiczymi. Z uwagi na to, że związki te jako antymetabolity powodują supresję szpiku, są stosowane tylko w ciężkich zakażeniach, zazwyczaj w skojarzeniu z amfoterycyną B. Grupa leków określanych jako echinocandyny działa na syntezę ściany komórkowej wrażliwych patogenów z rodzaju *Candida* i *Aspergillus*, lecz jest nieskuteczne w zwalczaniu innych rodzajów grzybów. Problemатyczne jest także pojawianie się szczepów o zmniejszonej wrażliwości na te związki [13]. Podstawową trudnością w poszukiwaniu i projektowaniu nowych grup leków przeciwgrzybiczych, jest fakt, że grzyby jako organizmy eukariotyczne mają niewiele szlaków metabolicznych odmiennych od komórek ludzkich. Podstawowym ograniczeniem stosowanych obecnie w praktyce klinicznej leków przeciwgrzybiczych jest ich niska selektywność i związana z tym wysoka toksyczność oraz stale rosnąca liczba opornych patogenów. Z przytoczonych powyżej danych wynika, że istnieje, zauważana przez wielu autorów, pilna potrzeba poszukiwania nowych związków przydatnych do leczenia infekcji grzybiczych [3, 14].

Duże nadzieje budzą badania ukierunkowane na syntezę pochodnych 1,3,4-tiadiazolu o aktywności przeciwgrzybiczej. Syntetyczne związki z grupy pochodnych 1,3,4-tiadiazolu wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej, takie jak np. przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe czy przeciwzapalne, opisane w przykładowych publikacjach przeglądowych [15, 16]. Pochodne należące do grupy 5-podstawionych 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazoli są słabo poznane pod kątem ich aktywności przeciwgrzybiczej. W obecnej pracy do badań wybrano związek o nazwie 2-(4-fluorofenylamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazol (FABT). Związek FABT został zsyntetyzowany w katedrze chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i opatentowany jako substancja o aktywności przeciwnowotworowej [17]. Liczne publikacje wykazują, że FABT znacznie hamuje proliferację komórek nowotworowych w układzie nerwowym (mięśak prądkowano komórkowy/rdzeniowy, nerwiak niedojrzały i glejak) i innych narządach (gruczołakorak okrężnicy i płuc). Wykazano, że *in vitro* FABT w dawkach wykazujących działanie przeciwnowotworowe nie miał wpływu na żywotność komórek prawidłowych (hepatocytów, astrocytów, fibroblastów skóry), wykazywał natomiast działanie troficzne oraz neuroprotektoryjne w neuronach narażonych na działanie neurotoksycznych środków takich jak deprywacja surowicy

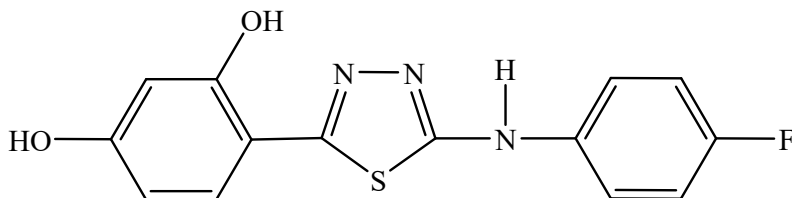
lub obecność glutaminianu [18]. W literaturze zostały również szeroko opisane bromo- [19], chloro- [20] i fluoro- [21] izomery FABT, gdzie zostało udokumentowane ich działanie przeciwnowotworowe. Pochodna 4BrABT ujawniła znaczącą neurotrofię i działanie neuroprotektoryjne w ośrodkowym układzie nerwowym oraz działanie przeciwnowotworowe, dzięki czemu może znaleźć zastosowanie jako związek zmniejszający neurotoksyczność i stosowanych cytostatyków [22]. Ważna aktywność 4ClABT, opisana także dla bromo- i fluoro-izomerów [19, 21], to hamowanie ruchliwości komórek związanym z procesem przerzutowania raka, co czyni go także potencjalnym środkiem przeciwnowotworowym. Ponadto wykazano niską cytotoksyczność wobec ludzkich fibroblastów skóry, hepatocytów i astrocytów [23].

Aktywność przeciwgrzybicza FABT została dotychczas określona tylko wobec szczepów *Candida* jako średnia wartość MIC (minimal inhibitory concentration), metodą rozcieńczeń na płytkach agarowych [24]. Dotychczas związek ten nie był przebadany pod kątem aktywności przeciwko innym niż *Candida* patogenom grzybowym. Nie znane są mechanizmy przeciwgrzybiczego działania pochodnych 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazolu, ani ich interakcje z innymi lekami przeciwgrzybiczymi. W obecnej pracy określono dla związku FABT minimalne stężenie hamujące namnażanie komórek grzybowych (MIC) oraz wartość minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC) wobec szczepów *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula mucilaginosa* i *Trichophyton rubrum* oraz jego aktywność cytotoksyczną wobec prawidłowych komórek ssaczy.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Struktura chemiczna FABT

2-(4-fluorofenyloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazol (FABT) został zsyntetyzowany w procesie endocyklizacji z sulfinylbis-(2,4-dihydroksytiobenzoylu) i 4-(4-fluorofenylo)-3-tiosemicarbazynu [18] w zespole prof. Andrzeja Niewiadomego. Wzór strukturalny został przedstawiony na rys.1.



Rys.1. Struktura chemiczna 2-(4-fluorofenyloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazolu (FABT) [18].

### 2.2. Badanie aktywności przeciwgrzybiczej

Wrażliwość patogenów grzybowych na FABT badano *in vitro* z wykorzystaniem standardowych szczepów *Candida albicans* NCPF 3153, *Candida parapsilosis* ATCC 20246, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger* i *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, metodą mikrorozcieńczeń na płytce 96 dołkowej, przez wyznaczenie wartości minimalnych dawek inhibicyjnych – MIC (*minimal inhibitory concentration*). Stosowano standardowe przepisy metodyczne zalecane przez Clinical

and Laboratory Standards Institute (CLSI), dokument M27-A3 [25] i M38-A2 [26], odpowiednio dla testowania wrażliwości drożdży i grzybów pleśniowych. Wprowadzono modyfikację metody polegającą na dodatku 2 % glukozy do podłoża RPMI 1640, w celu zapewnienia optymalnych warunków wzrostu dla grzybów. Szczepy przechowywano w Viabank™ cryogenic storage vials (Medical Wire&Equipment Co Ltd), w temp. -70°C. Przed rozpoczęciem eksperymentów, komórki drożdżaków inokulowano do płynnego podłoża YPD (1% ekstrakt drożdżowy, 2% baktepepton, 2 % glukoza w 0,01 M buforze fosforanowym o pH 7) i hodowano przez 24 h w temp. 35°C, na wytrząsarce, w celu uzyskania hodowli w fazie logarytmicznego wzrostu. Zarodniki *A. Niger* i *T. rubrum* inokulowano na podłoże YPD zestalone agarem i hodowano w temp. 27°C, aż do uzyskania zarodników. W celu wyznaczenia wartości MIC przygotowywano inokulum o końcowej gęstości  $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$  komórek/ml dla drożdżaków i  $0,4 \times 10^4$ - $5 \times 10^4$ /ml dla zarodników grzybów pleśniowych, rozcieńczone w pożywce (zawierającej L-glutaminę, bez dwuwęglanów), zbuforowanej do pH 7,0 przy użyciu 0,165 mol/L 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS). W celu przygotowania roztworu wyjściowego FABT, odważono 0,625 mg tego związku i rozpuszczono w 200 µl DMSO, a po uzyskaniu klarownego roztworu pobrano z niego 143,36 µl i dodano do 500 µl glikolu propylenowego i 3 ml pożywki RPMI z dodatkiem 2% glukozy, otrzymując w ten sposób roztwór wyjściowy o stężeniu 128 µg/ml. Roztwór ten służył do uzyskania końcowych stężeń FABT (od 64 µg/ml do 0,5 µg/ml) na płytce 96 dołkowej, metodą serii dwukrotnych rozcieńczeń. Po dodaniu inokulum mikroorganizmów, płytki inkubowano przez 48 godz., w temp. 35°C lub 27°C, odpowiednio dla drożdżaków i grzybów pleśniowych. W przypadku *T. rubrum*, ze względu na powolny wzrost tego patogenu, hodowlę prowadzono przez 96 godz. Gęstość optyczną mierzono przy długości fali 600 nm w czytniku mikroplatek Infinite® 200 PRO (TECAN, Szwajcaria), po 24h i 48h hodowli. Jako wartości MIC przyjęto stężenia substancji całkowicie hamujące wzrost mikroorganizmów (brak widocznego wzrostu i zmętnienia optycznego).

W celu wyznaczenia wartości MFC (minimal fungicidal concentration), z dołków płytki, na której oznaczano MIC pobierano po 20 µl zawiesiny i wysiewano na płytki Petriego z pożywką YPD zestaloną agarem. Po 48 godz. inkubacji w temp. odpowiedniej dla danego szczepu, liczono wyrosłe kolonie. Jako wartość MFC Przyjmowano stężenie substancji, po zadziałaniu której nie obserwowano wzrostu kolonii.

### 2.3. Badanie cytotoksyczności wobec komórek ssaczych

Badanie cytotoksyczności FABT przeprowadzono z wykorzystaniem ludzkich prawidłowych fibroblastów skóry linii NHDF (adult skin, Lonza CC-2511), komórek typu nabłonkowego z jajnika chomika chińskiego *Cricetulus griseus* linii CHO-K1 (ATCC, CCL-61) oraz fibroblastów pochodzących z nerki afrykańskiej małpy zielonej *Cercopithecus aethiops* linii COS-7 (ATCC, CRL-1651).

Komórki przechowywano w ciekłym azocie, rozmrażano w temp. 37°C, następnie przelewano do butelek hodowlanych (Nuncion®) zawierających odpowiednie podłoże, po czym namnażano w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze z 5% CO<sub>2</sub>. Komórki COS-7 i NHDF hodowano na podłożu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture z L-glutaminą, 1000 mg/l glukozy i NaHCO<sub>3</sub>,



Sigma D6046), natomiast komórki CHO-K1 na podłożu DME/F-12 z L-glutaminą i buforem HEPES (F12, HyClone, SH30023.01). Do płynów hodowlanych dodawano 10% inaktywowanej termicznie bydlęcej surowicy płodowej (FBS, Gibco 10270) oraz roztwór antybiotyków zawierający penicylinę, streptomycynę i neomycynę (Sigma, P4083) w ilości 10µl/ml. Po uzyskaniu monowarstwy (ok. 80% konfluencji), komórki przepłukiwano buforem DPBS bez jonów wapnia i magnezu (Gibco), a następnie odklejano od dna naczynia używając roztworu 0,25 % trypsyny z dodatkiem EDTA i rozcieńczano podłożem hodowlanym do gęstości  $2 \times 10^4$  komórek/ml. Otrzymaną zawiesinę komórek, rozlewano do płytek 96 dołkowych (Nunclon®), hodowano przez 24 godz., a po uzyskaniu monowarstwy, delikatnie ściągano płyn hodowlany i dodawano roztwór FABT o stężeniu od 0,5 do 128 µg/ml, w pożywce hodowlanej uzupełnionej 10% surowicą bydlęcą. Hodowlę prowadzono przez 48 godz., w inkubatorze w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO<sub>2</sub> i temp. 37°C.

#### **2.4. Analiza żywotności komórek z wykorzystaniem testu MTT**

Żywotność komórek określano przy pomocy testu MTT, w którym rozpuszczalny w wodzie związek o barwie żółtej, określany jako sól tetrazoliowa MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylotetrazoliowy) jest przekształcany przez enzymy obecne w aktywnych metabolicznie komórkach do formy zredukowanej – nierozpuszczalnego w wodzie formazanu, o barwie intensywnie fioletowej. Ilość powstałego formazanu jest wprost proporcjonalna do liczby komórek oraz ich aktywności metabolicznej. W przypadku martwych lub uszkodzonych komórek ilość barwnego, zredukowanego formazanu jest mniejsza, bądź nie powstaje. Do przeprowadzenia tego testu używano zestawu odczynników In Vitro Toxicology Assay Kit, MTT based (Sigma, TOX 1), postępując według instrukcji producenta. Roztwór MTT w PBS o stężeniu 5 mg/ml dodawano po 15 µl do dołków na płycie hodowlanej i inkubowano przez 3 godz., a następnie dodawano po 100 µl buforu rozpuszczającego kryształki formazanu, który równocześnie rozbija błonę komórkową. Ilość powstałego barwnika określano spektrofotometrycznie przy użyciu czytnika mikropłytek Infinite® 200PRO (TECAN, Szwajcaria), przy długości fali 570 nm. Na podstawie uzyskanych wyników ustalono wartość stężenia hamującego żywotność komórek w 50 % (IC<sub>50</sub>).

#### **2.5. Obserwacje mikroskopowe**

Prowadzone hodowle poddano również oglądowi pod mikroskopem kontrastowofazowym Leica DM 4000 B. W tym celu 10 µl próbki zawiesiny hodowlanej nanoszono na szkiełko podstawowe, przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i obserwowano przy powiększeniu 600x. Dokumentację fotograficzną wykonano przy użyciu kamery Leica DFC 500 i programu Leica Application Suite.

### **3. Wyniki i dyskusja**

#### **3.1. Aktywność przeciwgrzybicza FABT**

Pochodna 1,3,4-tiadiazolu – FABT wykazała wobec wszystkich badanych patogenów grzybowych aktywność hamującą namnażanie komórek (wyrażoną jako wartość MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*) oraz aktywność grzybobójczą (wyrażoną jako wartość MFC – *Minimal Fungicidal Concentration*) (tab. 1). Wartości MIC i MFC wyznaczano metodą serii dwukrotnych rozcieńczeń, przyjmując za

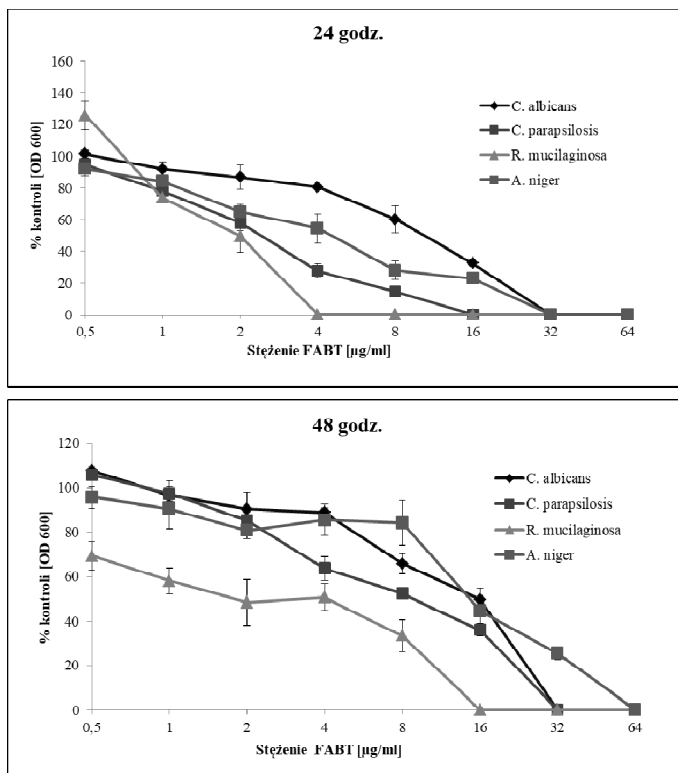
wynik takie stężenie FABT, przy którym nie obserwowano żadnego widocznego wzrostu patogenu. Ze względu na to, że badano dwukrotne rozcieńczenia substancji, uzyskiwane dla danego szczepu wyniki były w 100 % powtarzalne (dlatego przy wartościach MIC i MFC nie podano odchylenia standardowego). Badane szczepy różniły się między sobą wrażliwością na badany związek. Najbardziej wrażliwe okazały się szczepy *T. rubrum*, dla którego wartość MIC po 96 godz. wynosiła 8 µg/ml (oznaczanie przeprowadzono po 96 godz. ze względu na powolny wzrost tego patogenu) oraz *R. mucilaginosa*, dla którego wartość MIC po 48 godz. była na poziomie 16 µg/ml. Szczepy *C. albicans* i *C. parapsilosis* były średnio wrażliwe na badany związek (wartość MIC po 48 godz. wyniosła 32 µg/ml), natomiast szczep *A. niger*, dla którego wartość MIC<sub>48</sub> ustalono na poziomie 64 µg/ml okazał się najmniej wrażliwy. FABT wykazywał również działanie grzybobójcze, o czym świadczył brak wzrostu kolonii na pożywce zestalonej agarem, po zastosowaniu minimalnego stężenia FABT pokazanego w tabeli 1 jako wartość MFC. Wartość indeksu MFC/MIC<sub>48</sub> w żadnym z przypadków nie przekroczyła wartości 4, co dowodzi że FABT w zależności od stężenia ma zarówno aktywność grzybostatyczną jak i grzybobójczą (tabela 1).

Pomiar gęstości optycznej na płytkach 96 dołkowych po 24 i 48 godz. hodowli wykazał, że znaczące zahamowanie wzrostu patogenów grzybowych miało miejsce już przy dawkach FABT znacznie niższych niż wyznaczone wartości MIC (Rys. 1 i 2). Około 50 % zahamowanie wzrostu obserwowano już przy dawce FABT 2 µg/ml w przypadku *T. rubrum* i *R. mucilaginosa*, oraz przy stężeniu 8 µg/ml dla *C. parapsilosis* i przy 16 µg/ml dla *C. albicans* i *A. niger*.

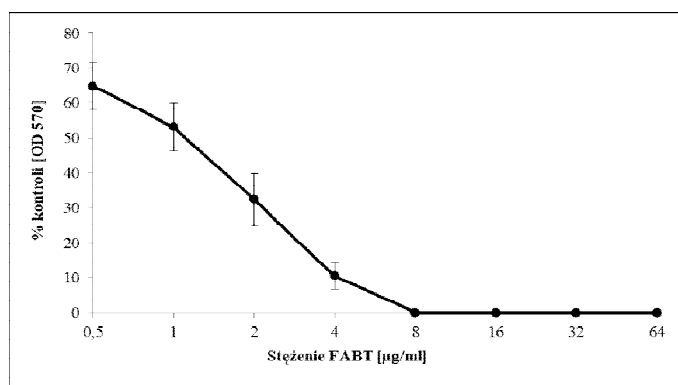
Tabela 1. Aktywność przeciwgrzybowa FABT wobec *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger* i *Trichophyton rubrum* wyrażona wartością MIC (minimalne stężenie hamujące, 100% zahamowanie wzrostu) badaną po 24 i 48 godzinach oraz MFC (minimalne stężenie grzybobójcze).

	FABT [µg/ml]			
	MIC <sub>24</sub>	MIC <sub>48</sub>	MFC	MFC/MIC <sub>48</sub>
<i>Candida albicans</i>	32	32	64	2
<i>Candida parapsilosis</i>	16	32	32	1
<i>Rhodotorula rubrum</i>	4	16	32	2
<i>Aspergillus niger</i>	32	64	96	1,5
<i>Trihophyton rubrum</i>	-	8 (MIC <sub>96</sub> )	16	2

Źródło: opracowanie własne



Rys. 1. Procentowe zahamowanie wzrostu komórek *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa* i *A. niger* (względem kontroli) przez związek FABT, w zakresie stężeń 0,5-64 µg/ml, po 24 i 48 godz. hodowli. Podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym

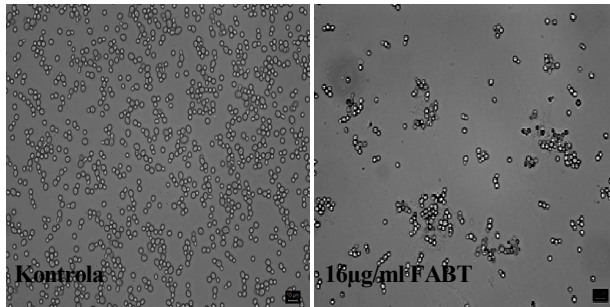


Rys.3. Procentowe zahamowanie wzrostu komórek *Triphopyton rubrum* (względem kontroli) przez związek FABT, w zakresie stężeń 0,5-64 µg/ml, po 96 godz. hodowli. Podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym

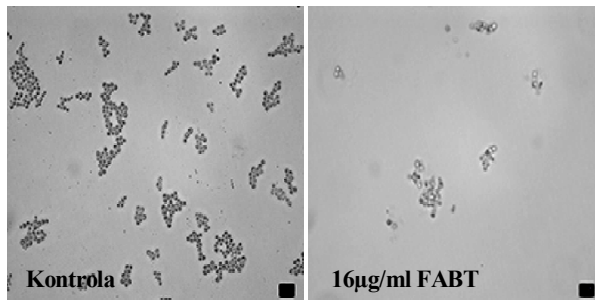
W literaturze aktywność przeciwgrzybicza związku FABT dotychczas została przedstawiona tylko na podstawie badań przesiewowych szerokiej grupy pochodnych 5-podstawionych 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazoli [24]. W cytowanej pracy, dla pochodnej FABT wyznaczono średnią wartość MIC dla 10 szczepów *Candida*

*albicans* na poziomie  $70,3 \pm 25,8$   $\mu\text{g/ml}$  oraz dla szczepów *Candida* innych niż *albicans* na poziomie  $41,7 \pm 12,9$   $\mu\text{g/ml}$ , metodą rozcieńczeń agarowych. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają, że szczepy drożdżaków inne niż *albicans* są bardziej wrażliwe na działanie FABT niż szczepy *Candida albicans*. Jest to szczególnie wartościowa cecha tego związku jako potencjalnego leku przeciwgrzybicznego, ponieważ szczepy *Candida* inne niż *albicans* często cechują się zmniejszoną wrażliwością na dostępne antybiotyki, szczególnie z grupy polienów i opornością na azole [5, 6]. Ponadto, w obecnej pracy po raz pierwszy wykazano wysoką aktywność grzybobójczą FABT wobec szczepu *Trichophyton rubrum*, należącego do grupy dermatofitów wywołujących grzybicę skóry i paznokci.

W obserwacjach mikroskopowych widoczne były znaczne różnice w morfologii komórek poddanych działaniu FABT w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Pod wpływem tego związku następowała wyraźna tendencja do spadku liczebności komórek, zmiana kształtu, oraz tworzenie się nienaturalnych agregatów. Efekt ten nasilał się wraz ze wzrostem dawki FABT. Zarówno w przypadku *C. albicans* (Fot. 1) jak i *R. mucilaginosa* (Fot. 2) zaobserwowano wyraźne zmniejszenie komórek, oraz zmianę kształtu z eliptycznego na kulisty. W wyniku zaburzenia podziałów komórkowych tworzyły się agregaty złożone z kilkudziesięciu komórek. Obserwowano dezintegrację większości komórek zamiast pojedynczych pączkujących drożdżaków.



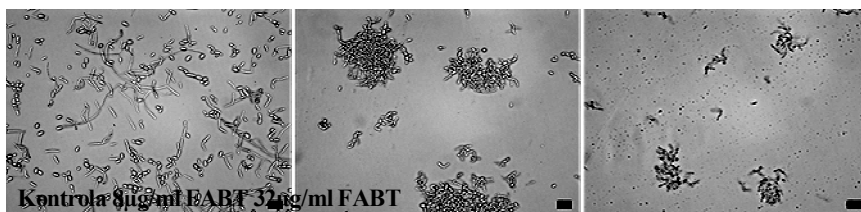
Fot. 1. *Candida albicans*



Fot. 2. *Rhodotorula mucilaginosa*

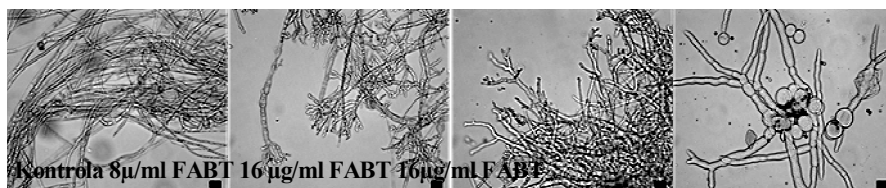
Obserwacja komórek *C. parapsilosis* (Fot. 3) wykazała, że są bardziej wrażliwe niż komórki *C. albicans*. Stopniowo zwiększane stężenie FABT powodowało coraz większe tworzenie się agregatów komórkowych, co również może świadczyć

o zaburzonych podziałach komórkowych. Komórki zmieniły swój kształt, stawały się znacznie mniejsze, z zagęszczoną cytoplazmą. Traciły też zdolność do tworzenia pseudostrzępek, które uważane są za formy inwazyjne *Candida*.

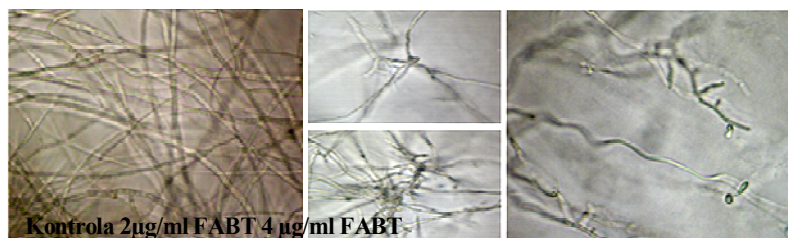


Fot. 3. *Candida parapsilosis*

W kontrolnej hodowli *Aspergillus niger* obserwowano dużą ilość zarodników oraz liczne regularne, nierozgałęzione strzępki. Po zastosowaniu FABT obserwowano zahamowanie tworzenia zarodników oraz zmiany w morfologii strzępek, polegające na zahamowaniu ich wzrostu i tworzeniu licznych krótkich rozgałęzień w szczytowych fragmentach (Fot.4). Podobne zmiany obserwowano w hodowli *T. rubrum* (Fot. 5).



Fot. 4. *Aspergillus niger*

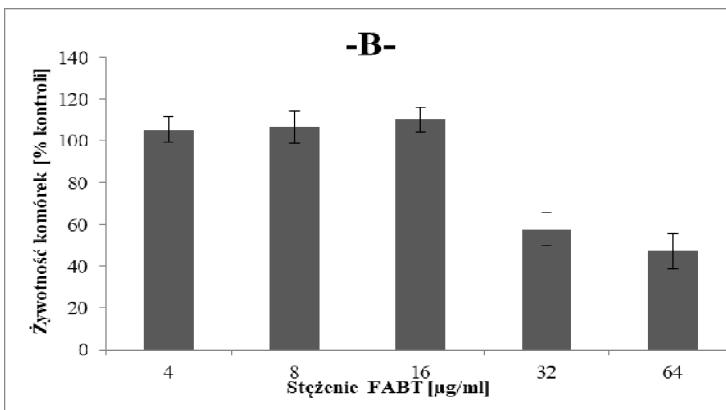
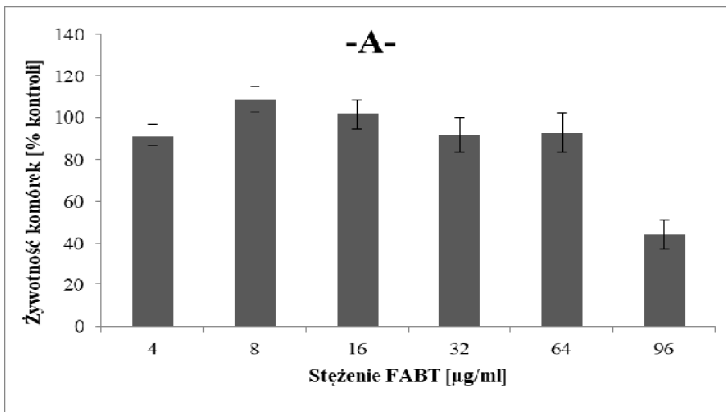


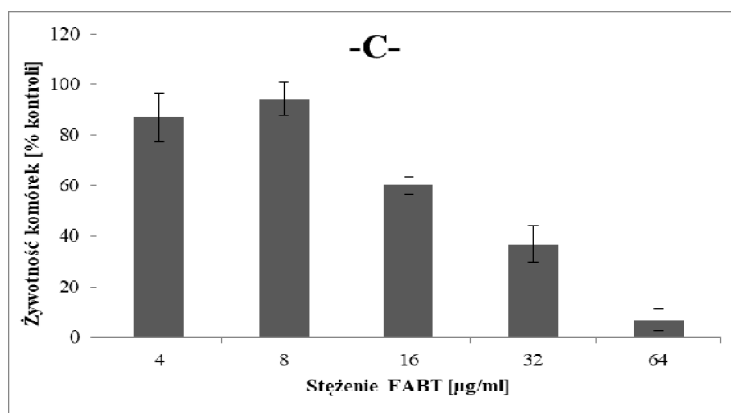
Fot. 5. *Trichophyton rubrum*

### 3.2. Aktywność cytotoksyczna FABT wobec komórek ssaczych

Cytotoksyczność FABT badano wobec ludzkich prawidłowych fibroblastów skóry (linia NHDF), komórek typu nabłonkowego z jajnika chomika chińskiego (linia CHO-K1) oraz fibroblastów pochodzących z nerki afrykańskiej małpy zielonej (linia COS-7) *in vitro*. Wszystkie linie komórkowe poddano działaniu FABT przez 48 godz. w zakresie stężeń od 0,5 do 96 µg/ml, a następnie wykonano test MTT pozwalający na określenie aktywności metabolicznej komórek. Żywotność komórek dla poszczególnych stężeń badanego związku przedstawiono w przeliczeniu na

procent kontroli. Analiza otrzymanych wyników pokazuje, że FAPT w stężeniach hamujących namnażanie komórek grzybowych nie wykazuje właściwości toksycznych wobec badanych prawidłowych komórek ssaczych (Rys. 4). Jednak wyższe stężenia tego związku okazały się toksyczne dla badanych linii komórkowych, przy czym poszczególne typy komórek różniły się znacznie wrażliwością. Stężenie FAPT hamujące żywotność komórek o 50% ( $IC_{50}$ ) wyznaczono na poziomie 96  $\mu\text{g/ml}$  dla NHDF, 64  $\mu\text{g/ml}$  dla komórek COS-7 oraz 24  $\mu\text{g/ml}$  dla komórek CHO-K1. Najmniej wrażliwe okazały się ludzkie prawidłowe fibroblasty skóry. Obliczony indeks terapeutyczny, czyli stosunek stężenia substancji hamującej żywotność komórek ssaczych o 50% do minimalnego stężenia hamującego namnażanie komórek patogenów grzybowych okazał się najkorzystniejszy dla patogenu *Trichophyton rubrum* i ludzkich prawidłowych fibroblastów skóry (Tab. 2). Biorąc pod uwagę, że *T. rubrum* jest dermatofitem powodującym zakażenia skóry i paznokci u ludzi, można rozważyć zastosowanie związku FAPT jako czynnika leczniczego w przypadku grzybic powierzchniowych. W kolejnym etapie badań należałoby sprawdzić aktywność tego związku wobec szerszego zakresu patogenów grzybowych należących do grupy dermatofitów. Powierzchniowe zastosowanie FAPT powinno również przynieść pożądane efekty w przypadku zakażeń błon śluzowych grzybami z rodzaju *Candida* oraz *Rhodotorula*.





Rys. 4. Żywotność fibroblastów pochodzących z ludzkich prawidłowych fibroblastów skóry (A – linia NHDF, B – linia COS 7, C – linia CHO) po 72h hodowli w obecności FABT, mierzona przy pomocy testu MTT; podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym.

Tab. 2. Indeks terapeutyczny (CC<sub>50</sub> /MIC<sub>48</sub>) związku, obliczony na podstawie MIC<sub>48</sub> dla patogenów grzybowych i wartości IC<sub>50</sub> dla komórek ssaczych. MIC<sub>48</sub> – minimalne stężenie substancji hamujące namnażanie komórek grzybowych; IC<sub>50</sub> – stężenie substancji przy którym żywotność komórek ssaczych w hodowli in vitro zmniejsza się o 50%.

	Indeks terapeutyczny (IC <sub>50</sub> /MIC <sub>48</sub> )		
	NHDF	COS-7	CHO-K1
<i>C. albicans</i>	3	2	0,75
<i>C. parapsilosis</i>	3	2	0,75
<i>C. rhodotorula</i>	6	4	1,5
<i>A. niger</i>	1,5	1	0,375
<i>T. rubrum</i> *	12	8	3

\*W przypadku *T. rubrum* MIC wyznaczono po 96 godz.

#### 4. Wnioski

- Otrzymane wyniki pokazują, że FABT posiada właściwości hamujące namnażanie patogenów grzybowych, takich jak: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger* i *Trichophyton rubrum*, przy wartościach MIC<sub>48</sub> na poziomie od 8 do 64 µg/ml oraz właściwości grzybobójcze, przy wartościach MFC na poziomie od 16 do 96 µg/ml, w zależności od badanego szczepu.
- FABT w stężeniach hamujących namnażanie komórek grzybowych nie jest toksyczny wobec badanych prawidłowych komórek ssaczych. Jednak wyższe stężenia tego związku hamowały aktywność metaboliczną badanych komórek, przy wartościach IC<sub>50</sub> na poziomie od 24 do 96 µg/ml, w zależności od typu komórek.
- Najmniej wrażliwe na działanie badanego związku okazały się komórki linii NHDF (ludzkie prawidłowe fibroblasty skóry).

4. Najkorzystniejszy indeks terapeutyczny (stosunek IC<sub>50</sub>/MIC<sub>48</sub>), na poziomie 12, uzyskano w przypadku komórek NHDF i patogenu *Trichophyton rubrum* wywołującego grzybicę skóry i paznokci.
5. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania związku FABT jako czynnika terapeutycznego w leczeniu grzybic powierzchniowych wywołanych patogenami z rodzaju *Trichophyton*, a także *Candida* i *Rhodotorula*.

## Literatura

1. Low CY, Rotstein C., *Emerging fungal infections in immunocompromised patients*, F1000 Medicine Reports 2011, 3:14 (doi:10.3410/M3-14).
2. S. Huprikar, S. Shoham and the AST Infectious Diseases Community of Practice, *Emerging Fungal Infections in Solid Organ Transplantation*, American Journal of Transplantation 2013; 13, s. 262-271, Wiley Periodicals Inc. doi: 10.1111/ajt.12118
3. Castelli M. V., Derita M. G. & López S. N., *Novel antifungal agents: a patent review*, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2016, DOI: 10.1080/13543776.2017.1261113.
4. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ, Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ, Wannemuehler KA, Chiller TM., *Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)*, *Clinical Infectious Diseases*, 2010; 50, s. 1101-11. doi: 10.1086/651262.
5. Sulik-Tyszka B, Kacprzyk P, Mądry K, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Jędrzejczak W, Wróblewska M., *Aspergillosis of the Heart and Lung and Review of Published Reports on Fungal Endocarditis*, *Mycopathologia*, 2016; 181:583-588. doi:10.1007/s11046-016-0012-9.
6. Day, J.N., T.T. Chau, and D.G. Lalloo, *Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis*, *The New England Journal of Medicine*, 2013, 368(26), s. 2522-3.
7. Richardson M., Lass-Flörl C., *Changing epidemiology of systemic fungal infections*, *Clinical Microbiology and Infection*, 2008, s. 5-24.
8. Fröhlich-Nowoisky J, Pickersgill D. A., Despres V. R., Poschl U., *High diversity of fungi in air particulate matter*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106 (2009), s. 12814-12819.
9. Luan C., Xie L., Yang X., Miao H., Lv N., et al., *Dysbiosis of fungal microbiota in the intestinal mucosa of patients with colorectal adenomas*, *Science Reports*, 2015, s. 7890.
10. Huffnagle G. B., Noverr M. C., *The emerging world of the fungal microbiome*, *Trends in Microbiology*, 2013, 21, s. 334-341.
11. Mesa-Arango, A.C., Scorzoni, L., Zaragoza, O., *It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug*, *Frontiers in Microbiology* 3, 2012, article 286.
12. Kontoyiannis D.P. and R.E. Lewis, *Antifungal drug resistance of pathogenic fungi*, *Lancet*, 2002. 359(9312), s. 1135-44.
13. Eschenauer G., Depistel D. D., Carver P. L., *Comparison of echinocandin antifungals*, *Ther Clin Risk Manag*, 2007. 3(1), s. 71-97.
14. Perfect, J.R., *The antifungal pipeline: a reality check*, *Nat Rev Drug Discov*, 2017.
15. Gupta J. K., Yadav R. K., Dudhe R., Sharma P. K., *Recent Advancements in the Synthesis and Pharmacological Evaluation of Substituted 1, 3, 4-Thiadiazole Derivatives*, *International Journal of PharmTech Research*, 2010.



16. Jain A. K., Sharma S., Vaidya A., Ravichandran V., Agrawal R. K., *1,3,4-Thiadiazole and its Derivatives: A Review on Recent Progress in Biological Activities*, Chemical Biology & Drug Design, 2013; 81, s. 557-576.
17. Niewiadomy A., Matysiak J., Rzeski W., Opolski A., *Pochodna 1,3,4-tiadiazolu jako czynnika antynowotworowego oraz sposób otrzymywania pochodnej 1,3,4-tiadiazolu*, opis patentowy PL 205098 B1, 2004.
18. M. Juszcak, J. Matysiak, M. Szeliga, P. Pozarowski, A. Niewiadomy, J. Albrecht, W. Rzeski, *2-Amino-1,3,4-thiadiazole derivative (FABT) inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and induces cell cycle arrest in human non-small lung carcinoma cells*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012.
19. Rzeski W, Matysiak J, Kandefer-Szerszeń M., *Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole based compound*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007;15, s. 3201-3207.
20. Juszcak M., Matysiak J, Niewiadomy A., Rzeski W., *The activity of a new 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivative 4ClABT in cancer and normal cell*, Folia Histochemica et Cytobiologica, 2011.
21. Juszcak M, Matysiak J, Brzana W, Niewiadomy A, Rzeski W., *Evaluation of the antiproliferative activity of 2-(monohalogenophenylamino)-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles*, Arzneimittelforschung, 2008;58, s. 353-357.
22. Juszcak M., Walczak K., Langner E., Karpińska M., Matysiak J., Rzeski W., *Neuroprotective activity of 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivative 4BrABT – an in vitro study*, Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2013.
23. M. Juszcak, J. Matysiak, M. Szeliga, P. Pozarowski, A. Niewiadomy, J. Albrecht, W. Rzeski, *2-Amino-1,3,4-thiadiazole derivative (FABT) inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and induces cell cycle arrest in human non-small lung carcinoma cells*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012.
24. Matysiak, J., Malinski Z., *2-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole analogues: Antifungal activity in vitro against Candida species*, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2007. 33, s. 640-647.
25. CLSI, 2008a. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard*. CLSI Document M27-A2, second ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
26. CLSI, 2008b. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard*. CLSI Document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.

## **Aktywność przeciwgrzybicza 2-(4-fluorofenyloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazolu (FABT)**

### **Streszczenie**

Związki należące do grupy 1,3,4-tiadiazoli wykazują liczne korzystne właściwości biologiczne, do których zaliczyć można aktywność przeciwwirusową, przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwgruźliczą i przeciwnowotworową. Cechują się przy tym niską cytotoksycznością wobec komórek ludzkich. W prezentowanej pracy badano aktywność przeciwgrzybiczą 2-(4-fluorofenyloamino)-5-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazolu (FABT) wobec patogenów grzybowych, takich jak: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger* i *Trichophyton rubrum*, w warunkach hodowli *in vitro*, metodą mikrorozcieńczeń na płytce 96 dołkowej, przez wyznaczenie wartości minimalnych dawek inhibicyjnych – MIC (minimal inhibitory concentration). Stosowano standardowe przepisy metodyczne zalecane przez Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Otrzymane wyniki pokazują, że badana pochodna 1,3,4-tiadiazolu posiada właściwości hamujące namnażanie patogenów grzybowych, przy wartościach MIC<sub>48</sub> na poziomie od 8 do 64 µg/ml oraz właściwości

grzybobójcze, przy wartościach MFC (Minimal Fungicidal Concentration) na poziomie od 16 do 96  $\mu\text{g/ml}$ , w zależności od badanego szczepu.

Aktywność cytotoksyczną FABT określano wobec prawidłowych komórek ssących linii NHDF, CHO-K1 i COS-7, przy użyciu testu MTT. Stwierdzono, że FABT w stężeniach hamujących namnażanie komórek grzybowych nie jest toksyczny wobec badanych prawidłowych komórek ssących. Jednak wyższe stężenia tego związku hamowały aktywność metaboliczną badanych komórek, przy wartościach  $\text{IC}_{50}$  (stężenie hamujące żywotność komórek o 50 %) na poziomie od 24 do 96  $\mu\text{g/ml}$ , w zależności od typu komórek. Najmniej wrażliwe na działanie badanego związku okazały się komórki linii NHDF (ludzkie prawidłowe fibroblasty skóry). Najkorzystniejszy indeks terapeutyczny (stosunek  $\text{IC}_{50}/\text{MIC}_{48}$ ), na poziomie 12, uzyskano w przypadku komórek NHDF i patogenu *Trichophyton rubrum* wywołującego grzybicę skóry i paznokci. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość zastosowania związku FABT jako czynnika terapeutycznego w leczeniu grzybic powierzchniowych wywołanych patogenami z rodzaju *Trichophyton*, a także *Candida* i *Rhodotorula*.

Słowa kluczowe: 1,3,4-tiadiazole, aktywność przeciwgrzybicza, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum*.

## Antifungal activity 2- (4-fluorophenylamino) -5- (2,4-dihydroxyphenyl) -1,3,4-thiadiazole (FABT)

### Abstract

The compounds belonging to the group of 1,3,4-thiadiazole derivatives have numerous beneficial biological properties, including antiviral, antibacterial, antifungal, antitubercular and antineoplastic activity. They are also characterized by the low cytotoxicity against human cells. In the present work the antifungal activity of 2-(4-fluorophenylamino)-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole (FABT) against fungal pathogens such as *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger* and *Trichophyton rubrum* was investigated in *in vitro* conditions, by microdilution method on a 96 well plate, by determining the minimal inhibitory concentration (MIC). The standard methodology recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) was used. The obtained results show that the tested 1,3,4-thiadiazole derivative has the inhibitory effect on the proliferation of fungal pathogens, with the  $\text{MIC}_{48}$  values between 8 and 64  $\mu\text{g/ml}$ , and the fungicidal properties, with minimal fungicidal concentrations (MFC) values at a level of 16-96  $\mu\text{g/ml}$ , depending on the tested strain. The cytotoxic activity of FABT was determined *in vitro* against normal mammalian cells of cell lines such as NHDF, CHO-K1 and COS-7, using the MTT test. It was found that FABT at concentrations inhibiting fungal cell proliferation is not cytotoxic to the tested normal mammalian cells. However, higher concentrations of this compound inhibited the metabolic activity of the cells. The concentrations inhibiting cell viability by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) were at the level of 24-96  $\mu\text{g/ml}$ , depending on the type of cells. The least sensitive to FABT compound turned out to be the normal human skin fibroblasts (NHDF cell line). The most beneficial therapeutic index ( $\text{IC}_{50}/\text{MIC}_{48}$  ratio), at the level of 12, was obtained in the case of NHDF cells and the pathogen *Trichophyton rubrum*, causing skin and nail mycosis. The obtained results indicate the possibility of using the FABT compound as a therapeutic agent in the treatment of superficial fungal infections caused by pathogens from the genus *Trichophyton*, as well as *Candida* and *Rhodotorula*.

Keywords: 1,3,4-thiadiazoles, antifungal activity, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum*.

## Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktu roślinnego z *Dionaea muscipula*

### 1. Wstęp

Rośliny owadożerne są grupą obejmującą ponad 600 gatunków, które stały się obiektem zainteresowania hodowców i naukowców na całym świecie nie tylko ze względu na charakterystyczny dla nich sposób pobierania pokarmu z otoczenia, ale również na zawarte w nich składniki aktywne takie jak naftochinony czy flawonoidy. Liczne doniesienia naukowe wskazują, że rośliny te mogą oddziaływać bakterio-bójczo, grzybobójczo, cytostatycznie, przeciwzapalnie, przeciwalergicznie czy przeciwzakrzepowo. Rośliny owadożerne wykorzystywano w medycynie ludowej jako lek na kaszel czy astmę. Ziele muchołówki polecano w leczeniu grypy, krztuśca, anginy, gruźlicy i zapalenia zatok [1-3].

Najbardziej popularnymi gatunkami roślin owadożernih są *Drosera aliciae* oraz *Dionaea muscipula*, które często ze sobą mylone [1-5].

### 2. Pochodzenie *Dionaea muscipula*

*Dionaea muscipula* (Solander ex Ellis 1768), znana jako muchołówka amerykańska, należy do rodziny *Droseraceae* (rosiczkowate) z rodzaju *Dionaea* [6]. W naturalnym środowisku występuje jedynie w Karolinie Północnej i Karolinie Południowej Stanów Zjednoczonych Ameryki sąsiadując tam z innymi przedstawicielami roślin owadożernih. *Dionaea muscipula* jest rośliną chronioną, zagrożoną wyginięciem. Znajduje się na liście CITES – Convention on International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora. W naturze *Dionaea muscipula* rosną blisko siebie tworząc skupiska liczące tysiące osobników. Jest to możliwe ponieważ rośliny opanowały do perfekcji rozmnażanie poprzez podział. Dzięki czemu z jednego osobnika w krótkim czasie powstają kolejne. Niestety, ale kolonie tych roślin są coraz mniej liczne, ze względu na zmieniające się warunki środowiska oraz rozrost innych organizmów, ograniczających dostęp do światła niewielkim muchołówkom. W 1992 roku wdrożono w życie zakaz pobierania organizmów ze środowiska naturalnego, w ten sposób *Dionaea muscipula* zyskała większe szanse na utrzymanie się w naturze, a rośliny zaczęto hodować na skalę przemysłową w kulturach *in vitro* [6-9].

*Dionaea muscipula* jest jedynym gatunkiem rodzaju *Dionaea*, jednak wielu hodowców nieustannie dąży do powstawania nowych odmian. Dzięki czemu gatunek ten jest bardzo urozmaicony.

<sup>1</sup> zuzannaorwat@wp.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

<sup>2</sup> mnabrdalik@uniopole.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

<sup>3</sup> agna@uniopole.pl, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, www.uni.opole.pl.

## 2.1. Charakterystyka *Dionaea muscipula*

Muchołówka amerykańska jest rośliną wieloletnią, u której bulwiaste kłącze (bulwa), zakończone wiązkowym systemem korzeniowym znajduje się około 10cm pod ziemią. Wyrastają z niej liście składające się z części asymilacyjnej, często delikatnie sercowatego kształtu oraz części przekształconej w pułapkę. Pułapka to najbardziej charakterystyczna część muchołówki, w zależności od stopnia nasłonecznienia jej wewnętrzna część jest mniej lub bardziej wybarwiona na czerwono. Pułapka składa się z dwóch blaszek zakończonych kilkumilimetroowymi „zębami”, a na każdej z nich znajduje się około 6 włosków czuciowych [6, 10, 11]. Odpowiedni rozstaw „zębów” na brzegach blaszek, umożliwia ucieczkę zbyt małej zdobyczy, dzięki czemu roślina nie traci energii. Żeby jednak doszło do zamknięcia się pułapki, włoski czuciowe muszą zostać stymulowane przynajmniej dwukrotnie. Kiedy owad jest już w pułapce, blaszki zatrząskują się, a gdy ofiara próbuje się uwolnić, pułapka zaciska się coraz mocniej i rozpoczyna się proces trawienia. Pułapki zazwyczaj zamykają się i ponownie otwierają około 3-4 razy, ale po strawieniu owada często tracą zdolność do zamykania. Roślina posiada również białe kwiaty, które pojawiają się zwykle na przełomie wiosny i lata. Kwiaty są umiejscowione na szczycie pędu o długości do 30 cm. Tak długi pęd chroni owady zapylające kwiaty przed schwytaniem przez pułapki [6,11].

## 2.2. Hodowla *Dionaea muscipula*

Metod hodowli Muchołówki amerykańskiej jest wiele: z liścia z łodygi, czy nasion. W środowisku naturalnym rośliny te namnażają się poprzez nasiona oraz podział kłącza tworząc liczne kolonie. Najczęściej wykorzystywaną na skalę przemysłową jest hodowla *in vitro* [13, 14].

Hodowla *Dionaea muscipula* wykorzystywana w badaniach wymaga stałej opieki, odpowiedniego podłoża w postaci mieszaniny torfu z gruboziarnistym piaskiem w stosunku 1:1 lub 2:1 oraz podlewania poprzez podsiąkanie, bo bardzo istotnym jest utrzymywanie odpowiedniej wilgotności [6, 14, 15].

## 2.3. Właściwości *Dionaea muscipula*

Pierwsze doniesienia na temat leczniczego działania roślin z rodziny *Droseraceae* pojawiły się już w medycynie ludowej około XII wieku. Rośliny owadożerne były stosowane jako lek m.in. na kaszel, astmę, bronhit, koklusz, czy zapalenie oskrzeli. Doniesienia naukowe mówią o ich oddziaływaniu: przeciwalergicznym, przeciwzakrzepowym, poprawiającym odporność organizmu, przeciwskurczowym, przeciwnowotworowym, przeciwtleniającym, przeciwzapalnym oraz bakteriobójczym i grzybobójczym. Funkcje te zawdzięczają metabolitom wtórnym w postaci naftochinonów oraz flawonoidów. Naftochinony służą roślinie do obrony przed mikroorganizmami, pasożytami oraz owadami roślinożernymi. To one są odpowiedzialne za działanie bójcze wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz właściwości przeciwnowotworowe. Pozostałe wymienione oddziaływania to głównie zasługa flawonoidów [1, 5, 12].

Celem przeprowadzonych badań była ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągów z *Dionaea muscipula* wobec wybranych szczepów mikroorganizmów.

### 3. Materiały i metody

Materiał do badań pozyskano z hodowli własnej *Dionaea muscipula*, która obejmowała dwie odmiany: Regular Form (Ryc. 1) oraz Red Green (Ryc. 2). Odmiany te zostały wybrane ze względu na swoje masywne pułapki.

Regular Form jest wyjściową odmianą *Dionaea muscipula*, którą charakteryzuje delikatnie wybarwiona pułapka i jasno-zielona część asymilacyjna liścia. Natomiast forma Red Green posiada intensywnie wybarwioną pułapkę, koloru czerwono-bordowego oraz ciemno-zieloną część asymilacyjną liścia. Odmiany te cechuje stosunkowo duża odporność na niekorzystne warunki.



Rycina 1. Dojrzała odmiana Regular Form [opracowanie własne]



Rycina 2. Dojrzała odmiana Red Green [opracowanie własne]

Ekstrakty roślinne powstały z dwóch hodowli prowadzonych w podobnych warunkach przez trzy miesiące. Pierwsza z nich została poddawana oddziaływaniu światła niebieskiego przez 19 godzin na dobę, natomiast druga miała dostęp do światła słonecznego. Światło niebieskie spowodowało znaczny przyrost masy roślin w porównaniu do tych eksponowanych na światło słoneczne. Hodowla wymagała systematycznego podlewania średnio co drugi dzień, poprzez podsiąkanie. Wlewano około 1 cm wody demineralizowanej do podstawki. Na bieżąco usuwano obumarłe części rośliny w celu zmniejszenia ryzyka powstania pleśni na podłożu. Podłoże zostało skomponowane z mieszaniny torfu z gruboziarnistym piaskiem w stosunku 2:1.

### 3.1. Przygotowanie ekstraktu roślinnego

Po przeprowadzeniu 3-miesięcznej hodowli odmian Regular Form oraz Red Green, w określonych warunkach uprawy, przygotowano cztery ekstrakty roślinne.

W tym celu pobrano pułapki, które następnie suszono w suszarce w temperaturze 50°C przez 24 godziny. Podczas suszenia pułapki straciły od 95% do 98% swojej masy. Następnie zostały zmiażdżone i dokładnie roztarte do postaci proszku w moździerzu. Tak przygotowany proszek został zważony (masa 0,05 g), umieszczony w zlewce do której dodano 15 ml metanolu. Materiał został poddany sonifikacji, a następnie przesączony.

Kolejnym etapem było odparowanie alkoholu przy pomocy wyparki wodnej w temperaturze 60°C. Do pozostałości w kolbie dodano 3 ml 1 M HCl i po zmieszaniu ogrzano substancję w temperaturze 100°C przez 30 min pod chłodnicą zwrotną. Po ostudzeniu preparat został ekstrahowany eterem dietylowym. Trzykrotnie płukano kolby 5 ml eteru dietylowego. Po rozwarstwieniu się substancji, odlano zbędny materiał. Pozostałą część ponownie poddano odparowaniu w wyparce w temperaturze 60°C. Suchy materiał potraktowano 1 ml rozpuszczalnika, którym była mieszanina heksanu oraz tetrahydrofuranu (1:1 v/v) [4].

Otrzymane ekstrakty oznaczono jako:

- RF ŚN – hodowla odmiany Regular Form prowadzona przy świetle niebieskim;
- RG ŚN – hodowla odmiany Red Green prowadzona przy świetle niebieskim;
- RF P – hodowla odmiany Regular Form prowadzona przy świetle słonecznym;
- RG P – hodowla odmiany Red Green prowadzona przy świetle słonecznym.

### 3.2. Oznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej

Aktywność przeciwdrobnoustrojową badanego ekstraktu określono wobec referencyjnych szczepów bakterii: *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) oraz grzybów *Candida albicans* (ATCC 10231). Przygotowano inokulum badanych szczepów o gęstości 0,5 w skali McFarlanda poprzez zawieszenie kolonii w płynie fizjologicznym z dodatkiem Tweenu 80.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano metodę dyfuzyjno-krażkową w celu wyznaczenia wartości minimalnego stężenia hamującego MIC (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*).

Na stałe podłoże Mueller-Hinton (BioMaxima) oraz YPD – Yeast extract Peptone Dextrose (BioMaxima) naniesiono i rozprowadzono po 100 µl zawiesiny badanych

bakterii i grzybów. Następnie ułożono sterylne krażki bibułowe (średnica  $\varnothing$  5,0 mm), które nasączono 20  $\mu$ l ekstraktu roślinnego, sterylnej wody jak kontroli negatywnej. Kontrolę pozytywną stanowiły gotowe krażki z antybiotykiem ampicyliną i kolistyną w przypadku wszystkich bakterii i nystatyną dla drożdży. Oznaczenia przeprowadzono w czterech powtórzeniach. Inkubację bakterii prowadzono w temperaturze 37°C/24 h, a drożdży w 30°C/48 h. Następnie zmierzono strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów [mm].

#### 4. Wyniki

W prezentowanej pracy przebadano cztery różne ekstrakty z *Dionaea muscipula* w kierunku ich wykorzystania w zwalczaniu patogennych bakterii i grzybów.

W Tabeli 1 podsumowano aktywność przeciwdrobnoustrojową ekstraktów z muchołówki amerykańskiej. Uwzględniono odmianę muchołówki oraz rodzaj użytego światła. W oparciu o uzyskane strefy zahamowania wzrostu testowane mikroorganizmy podzielono na: odporne przy strefie  $\leq 10$  mm, średnio wrażliwe przy strefie mieszczącej się w granicach  $>10 \sim \leq 27$  mm oraz wrażliwe, gdy strefa była  $>27$  mm [5] w porównaniu do kontroli antybiotykowych. Na tej podstawie stwierdzono iż odporne na działanie analizowanych ekstraktów były bakterie Gram-ujemne: *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*. Natomiast najbardziej wrażliwe okazały się drożdże: szczep *C. albicans*. W tym wypadku wysoką skutecznością wykazał się ekstrakt pozyskany z odmiany Regular Form hodowanej w świetle niebieskim (RF ŚN).

Tabela 1. Wyniki badań wrażliwością ekstraktu z *Dionaea muscipula* dla wybranych szczepów.

Próba	Strefa zahamowania wzrostu			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
RF ŚN	O	ŚW	ŚW	W
RG ŚN	ŚW	ŚW	O	ŚW
RF P	O	ŚW	O	ŚW
RG P	O	O	O	ŚW

(O) – szczep odporny, (ŚW) – szczep średnio wrażliwy, (W) – szczep wrażliwy

[Źródło: opracowanie własne]

W Tabeli 2 zestawiono średnie wartości stref zahamowania wzrostu uzyskane dla poszczególnych ekstraktów (z 4 powtórzeń). Ekstrakt z odmiany Regular Form hodowanej w świetle niebieskim (RF ŚN) najlepiej sprawdził się w przypadku *C. albicans* i *S. aureus*, a nieco gorzej wobec *E. coli* i *P. aeruginosa*. W przypadku ekstraktu uzyskanego z odmiany Red Green (RG ŚN), również najsilniejsze oddziaływanie odnotowano wobec *C. albicans*. Natomiast nie zaobserwowano stref zahamowania wzrostu dla szczepu *P. aeruginosa*. Prowadzenie hodowli w świetle słonecznym skutkowało uzyskaniem ekstraktów o znacznie niższej aktywności przeciwdrobnoustrojowej, niezależnie od odmiany muchołówki. Najsłabsze oddziaływanie ekstraktów wykazano wobec *P. aeruginosa* oraz *E. coli*. Strefy zahamowania wzrostu nie przekraczały w tym przypadku 10 mm. Największe strefy zahamowania wzrostu wynoszące 19,25 oraz 17,25 mm uzyskano dla grzybów oraz

gronkowca złocistego po zastosowaniu ekstraktu z odmiany Regular Form (RF P). Ekstrakty z odmiany Red Green hodowanej w warunkach światła słonecznego nie dały żadnych obiecujących wyników. Reasumując najbardziej wrażliwym szczepem były drożdże (19,06 mm), średnio wrażliwym gronkowiec (14,69 mm), a opornymi pałeczka ropy błękitnej (4,69 mm) i pałeczka okrężnicy (9,31 mm).

Tabela 2. Wyniki stref zahamowania wzrostu [mm] (mediana z 4 powtórzeń) badanych patogenów wobec przygotowanych ekstraktów z *Dionaea muscipula*.

Próba	Strefa zahamowania wzrostu [mm]			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
RF ŚN	8,00	18,50	10,75	28,00
RG ŚN	13,25	13,00	5,00	18,50
RF P	8,25	17,25	8,00	19,25
RG P	7,75	10,00	5,00	10,50
Średnia	9,31	14,69	7,19	19,06

[Źródło: opracowanie własne]

Porównano również uzyskane najkorzystniejsze strefy zahamowania wzrostu analizowanych ekstraktów ze strefami uzyskanymi dla antybiotyków (Tabela 3). Jedynie w przypadku *C. albicans* ekstrakt (RG ŚN) okazał się skuteczniejszy od zastosowanego antybiotyku o 40%. Ekstrakt ten był jedynie o około 5% mniej aktywny wobec *E. coli* w porównaniu do antybiotyku.

Tabela 3. Wyniki stref zahamowania wzrostu [mediana z 4 powtórzeń]: najlepszy ekstrakt względem badanego antybiotyku.

Patogen	Strefa zahamowania wzrostu [mm]			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Antybiotyk	14,00	24,00	15,00	20,00
Ekstrakt	13,25 (RG ŚN)	18,50 (RF ŚN)	10,75 (RF ŚN)	28,00 (RF ŚN)

[Źródło: Opracowanie własne]

## 5. Dyskusja

W dobie rosnącej lekooporności i poszukiwaniu alternatywnych metod leczenia, nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych, badacze coraz większą uwagę skupiają się na środkach pochodzenia roślinnego. Rośliny owadożerne jak muchołówka amerykańska zyskują na znaczeniu bo są źródłem substancji, które być może w przyszłości pomogą w zwalczaniu niektórych patogenów. Kluczowym w działaniu ekstraktu roślinnego jest nie tylko odmiana rośliny, ale sposób jej hodowli i sposób pozyskania samej substancji.



Analiza metodyki i wyników badań własnych pokazuje, że stoją one w opozycji do wyników otrzymanych przez Ogihara i wsp. [5], którzy analizowali ekstrakty z *Dionaea muscipula* przygotowane na bazie różnego rodzaju rozpuszczalników: metanolu, etanolu, propanolu, acetonu, octanu etylu, metyloetyloketonu chloroformu oraz heksanu. Autorzy na przykładzie szczepów *S. aureus* i *E. coli* stwierdzili, że bakterie Gram-dodatnie są bardziej wrażliwe na działanie wyciągów roślinnych w porównaniu do bakterii Gram-ujemnych. Najbardziej efektywne były wyciągi przygotowane z wykorzystaniem etanolu, octanu etylu oraz chloroformu [5].

Zbliżone strefy zahamowania wzrostu w swoich badaniach wykazali Ogihara i wsp.. Niezależnie od użytego ekstraktu (metanolowego lub etanolowego) strefy zhamowania wzrostu dla *E. coli* wynosiły około 10 mm, a dla *P. aeruginosa* 8 mm. Natomiast dla *S. aureus* strefa inhibicji była dużą ponad 30 mm, co oznaczało wrażliwość szczepu na podany ekstrakt [5].

Testy mające na celu zbadanie działania przeciwdrobnoustrojowego przeprowadzili również Synowiec i wsp. Poddali oni wybrane szczepy bakterii i grzybów działaniu ekstraktu z liści borówki czernicy. Badania te miały na celu podobnie jak w przypadku ekstraktów z *D. muscipula*, sprawdzenie czy można wykorzystać je jako konserwanty. Psucie się artykułów spożywczych oraz preparatów kosmetycznych, alergizujące i szkodliwe działanie, obecnie stosowanych substancji konserwujących, stanowi obecnie spory problem dla producentów i naukowców, dlatego też podobne badania coraz częściej są przeprowadzane. Wyniki badań Synowiec i wsp. wykazały wysoką skuteczność w przypadku bakterii i niską w przypadku grzybów w przeciwieństwie do badań nad *D. muscipula*, gdzie grzyby były mniej odporne niż bakterie [16].

## 6. Wnioski

Otrzymane wyniki badań na ekstraktami pozyskanymi z różnych odmian mucholówki pozwalają stwierdzić wyższość odmiany Regular Form w walce przeciwdrobnoustrojowej. Kluczowym okazał się wybór odpowiednich warunków hodowlanych. Zastosowanie światła niebieskiego znacząco zwiększyło przyrost masy rośliny i choć hodowla jest bardziej wymagająca to aktywność bójcza pozyskanego ekstraktu jest lepsza. Aczkolwiek jest to aktywność tylko wobec drożdży z rodzaju *Candida* spp. W zakażeniach o etiologii Gram-ujemnej ekstrakt nie ma szans, szczególnie jeśli zastosowalibyśmy go do szczepów szpitalnych, które to charakteryzują się wysoką opornością krzyżową.

W przypadku bakterii Gram-dodatnich wydaje się, że zwiększenie stężenia mogłoby przyczynić się do lepszego działania. W aspekcie potencjalnego wykorzystania ekstraktu, zwłaszcza w przemyśle kosmetycznym, badania powinny być kontynuowane, zarówno w zakresie sposobów pozyskania ekstraktów jak i oceny ich aktywności wobec większego spektrum drobnoustrojów. Ekstrakty z *D. muscipula* mogłyby znaleźć zastosowanie w przemyśle kosmetycznym oraz spożywczym jako substancje hamujące rozwój drobnoustrojów, w zastępstwie za często szkodliwe oraz uczulające substancje konserwujące.

## Literatura

1. Królicka A., Szpitter A., Gilgenast E., Romanik G., Kaminski M., Lojkowska E., *Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors*. Enzyme Microbial, Technol 42(3), (2008), s. 216-221.
2. Jaszczolt M., Boczkaj G., Lewandowski A., Skrzypczak A., Królicka A., Kamiński M., *Badania nad doborem najkorzystniejszego składu eluantu do rozdzielania metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem chromatografii planarnej w normalnym i odwróconym układzie faz*, Camera separatora (2011), s. 147-160.
3. Banasiuk R., Kawiak A., Królicka A. *In vitro cultures of carnivorous plants from the Drosera and Dionaea genus for the production of biologically active secondary metabolites*, Biotechnologia 93(2), (2012), s. 87-96.
4. Kołodziejski D., Skrzypczak A., Gilgenast E., Królicka A., Kamiński M. *Porównanie efektywności wybranych technik ekstrakcji ługowania metabolitów wtórnych z suchego materiału roślin owadożernych z hodowli in vitro*, Camera Separatoria Vol. 3, No. 1, 2011, s. 185-199.
5. Ogihara H., Endou F., Furukawa S., Matsufuji H., Suzuki K., Anzai H. *Antimicrobial activity of the carnivorous plant dionaea muscipula against food-related pathogenic and putrefactive bacteria*, Biocontrol Science 18(3), 2013, s. 151-155.
6. Firszt O. P. *Mucholówka amerykańska Dionaea muscipula*, Broszura s. 4-24
7. Schulz B., Wittenberg L., Ziemssen A. Verlag A., *Fleischfressende Pflanzen* 1965, s. 112.
8. Podbielkowski Z. *Rośliny owadożerne*, Warszawa, Państwowe Zakłady Wydawnictw Szkolnych 1967.
9. Chamowitz D. *Zmysłowe życie roślin*, Wyd. W.A.B. 2012, s. 64-68, 135-138
10. Lydiane K, *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*, Timber Press (2013).
11. Rice B., *Carnivorous plants- classic perspectives and new research*, Biologist, 49(2002), s. 245.
12. Królicka A., Szpitter A., Gilgenast E., Romanik G., Kaminski M., Lojkowska E., *Stimulation of antibacterial naphthoquinones and flavonoids accumulation in carnivorous plants grown in vitro by addition of elicitors*, Enzyme and Microbial Technology, 42(3), 2018, s. 216-221.
13. Juniper B.E., Robins D.M., Joel D.M. *The carnivorous plants*. Academic Press, 1989, s. 12-20, 52-56, 74-83, 86-126.
14. Marek J., Krzywińska A., *Rozmnażanie wegetatywne roślin ozdobnych*, PWRiL, Poznań 2005, rozdział 8.3,12.
15. Barthlott W. *The curious world of carnivorous plants : a comprehensive guide to their biology and cultivation*, Portland, Oregon: Timber Press, 1946, s. 33-39.
16. Synwiec A., Gniewosz M., Bączek K., Węglorz Z., *Przeciwdrobnoustrojowe działanie wodno-etanolowego ekstraktu z liści borówki czernicy (Vaccinium myrtillus L)*, Bromat. Chem. Toksykol. XLIV, 2011, 3, s. 656-661.

## Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktu roślinnego z *Dionaea muscipula*

### Streszczenie

Rośliny owadożerne są przedmiotem badań, nie tylko ze względu na charakterystyczny dla nich sposób pobierania składników odżywczych z otoczenia, ale również z powodu ich pożądanego oddziaływania na mikroorganizmy. W piśmiennictwie znajdujemy potwierdzenie, że ekstrakty z roślin owadożernych mają działanie nie tylko bakteriostatyczne, ale również bakteriobójcze i grzybobójcze. Do badań wybrano jednego z przedstawicieli roślin owadożernych, *Dionaea muscipula* J. Ellis (MUCHOŁÓWKA amerykańska), w celu określenia ich aktywności biologicznej.

Materiałem do badań były odpowiednio przygotowanie ekstrakty z dwóch odmian *Dionaea muscipula*: Regular Form oraz Red Green. Hodowle prowadzono w warunkach światła niebieskiego i dla porównania światła słonecznego. W ten sposób otrzymano różne kombinacje ekstraktów, dla których określono aktywność wobec wybranych szczepów bakteryjnych i grzybiczych.

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że ekstrakty z muchołówki nie wykazują działania bójczego w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, są natomiast skuteczne w zahamowaniu wzrostu drożdży z rodzaju *Candida* spp. W przypadku bakterii Gram-dodatnich wydaje się, że zwiększenie stężenia mogłoby przyczynić się do wzrostu jego aktywności. Dlatego dalsze badania w celu optymalizacji warunków hodowli i pozyskania ekstraktu powinny być kontynuowane, zwłaszcza w aspekcie ich przemysłowego wykorzystania w przyszłości, m.in. w przemyśle kosmetycznym.

Słowa kluczowe: *Dionaea muscipula*, Muchołówka amerykańska, mikroorganizmy patogenne, metabolity wtórne.

## Evaluation of the activity antimicrobs of plant extracts from *Dionaea muscipula*

### Abstract

An insectivorous plants are the subject of the research, not only on account of way characteristic of them of taking nutrients up from surroundings, but also because of their desired influence on microorganisms.

In literature we are finding confirming that extracts from an insectivorous plants have not only bacteriostatic, but also antibacterial and fungicidal action.

One of the representatives of insectivorous plants, *Dionaea muscipula* J. Ellis (American flycatcher), was selected for the study in order to determine their biological activity. Conducted examinations included preparing appropriate extracts from two varieties: *Dionaea muscipula*: Regular Form and Reed Green. Cultivation of both varieties was carried out in different environmental conditions. In this way all sorts combinations of extracts, for which antimicrobial activity was determined were received.

The obtained results were confirmed by literature reports. Extracts of the American Flytrap do not show a bitter activity against Gram-negative bacteria, but are effective in inhibiting yeast growth. In the case of Gram-positive bacteria, it seems that increasing the concentration or amount of extract could increase its activity.

Therefore, further research in order to optimize the conditions of cultivation and obtaining the extract should be continued, especially in the aspect of their industrial use in the future, including in the cosmetics industry.

Keywords: *Dionaea muscipula*, pathogenic microorganisms, secondary metabolites.

## Potencjalne wykorzystanie bakteriofagów w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych wywołujących mastitis

### 1. Wstęp

Stany patologiczne gruczołu mlekowego od lat stanowią główną przyczynę strat ekonomicznych w hodowli krów mlecznych. Szacuje się, że ok. 20-50% krów choruje w ciągu roku na zapalenie gruczołu mlekowego, czyli *mastitis* [1-2].

Zapalenie gruczołu mlekowego obejmuje zarówno kliniczne jak i podkliniczne postaci *mastitis* u krów. Zapalenie kliniczne obejmuje widoczne objawy o różnym stopniu nasilenia zarówno w samym gruczole (zaczerwienienie, obrzęk, bolesność) jak i w mleku (barwa, konsystencja, smak). Zapalenie podkliniczne *mastitis* nie daje żadnych widocznych objawów, powoduje natomiast zwiększenie liczby leukocytów w mleku [3].

Zarówno kliniczna jak i podkliniczna forma *mastitis* stanowi reakcję organizmu krów na kolonizację przez drobnoustroje wnętrza wymienia. *Mastitis* u krów wywoływane jest przez ponad 150 rodzajów drobnoustrojów [3]. Najważniejszą grupę wśród nich stanowią bakterie, stąd stale prowadzone są badania obejmujące identyfikację w mleku poszczególnych szczepów wraz z oceną ich lekowrażliwości [4]. Odnotowuje się coraz większy problem zakażeń wywołanych przez wielolekooporne bakterie Gram-dodatnie. Wśród nich szczególnie niebezpieczne są metacyclinooporne gronkowce (MRSA – methycillin resistant *Staphylococcus aureus*) oraz paciorkowce bezmleczności: *Streptococcus agalactiae* i *Streptococcus dysgalactiae*. Okazuje się również, że w przypadku infekcji wywołanych przez powszechnie występujące szczepy gronkowców i paciorkowców wankomycyna, będąca często lekiem z wyboru okazuje się nieskuteczna [5]. Według danych epidemiologicznych w ostatnich latach istotną rolę w etiologii *mastitis*, stwarzających trudności terapeutyczne, stanowią również bakterie środowiskowe, głównie *Escherichia coli* i *Streptococcus uberis*. Poszczególne szczepy tych bakterii rozwijając mogą oporność krzyżową, a jak powszechnie wiadomo wzrost antybiotykooporności będzie miał ogromne znaczenie w profilaktyce i leczeniu zakażeń. Nieskuteczna i przedłużająca się terapia prowadzi do wyraźnego obniżenia wydajności mlecznej (w przebiegu subklinicznym wydajność spada do ok. 15%), pogorszenia jakości pozyskiwanego mleka, wzrostu kosztów leczenia weterynaryjnego oraz nałożenia karencji na mleko. Wobec wzrastającej oporności bakterii oraz zagrożeń, jakie niesie ze sobą powszechne stosowanie antybiotyków i chemioterapeutyków należy skupić się na poszukiwaniu alternatywnych metod leczenia. Jedną z nich może stać się biokontrola zakażeń bakteryjnych z wykorzystaniem bakteriofagów, czyli tak zwana terapia fagowa [6-9].

---

<sup>1</sup> monika\_karasiewicz@sggw.pl, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, www.sggw.pl.

Bakteriofagi są wirusami infekującymi bakterie. Zostały odkryte w 1915 roku przez Fredricka Williama Twota. Na początku lat 20. XX wieku, F.H. d'Hérelle podjął pierwsze próby leczenia z wykorzystaniem bakteriofagów, a w latach 30-tych produkowano już komercyjne preparaty fagowe. Jednak mimo potencjalnych zastosowań, słaba znajomość fizjologii fagów oraz ich niewłaściwe stosowanie były powodem spadku zainteresowania terapią fagową. W ostatnich latach, z powodu wzrastającej liczby opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki szczepów bakteryjnych terapia fagowa stała się ponownie obiektem zainteresowań firm i ośrodków naukowych na całym świecie [10].

Bakteriofagi zwykle wykazują swoistość względem swoich gospodarzy. Nie są również szkodliwe dla środowiska. To sprawia, że postrzegane są jako potencjalne czynniki terapeutyczne w zakażeniach bakteryjnych zwierząt. Zastosowanie fagów do zwalczania znaczących gospodarczo patogenów zwierząt bez negatywnego wpływu na środowisko wydaje się być obiecującym rozwiązaniem [11].

## **2. Bakteriofagi jako środki biokontroli**

Zdolność bakteriofagów do swoistej lizy komórek bakterii sprawiła, że szybko znalazły one zastosowania w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Jednak odkrycie antybiotyków w 1928 roku sprawiło, że porzucono badania nad zastosowaniem bakteriofagów w zwalczaniu patogenów bakteryjnych. Istotnym impulsem do wznowienia badań nad wykorzystaniem bakteriofagów była szybko narastająca wśród różnych gatunków liczba szczepów bakteryjnych opornych na masowo stosowane w paszach antybiotyki oraz rosnąca presja środowisk konsumenckich na produkcję bezpiecznej żywności o wysokiej jakości biologicznej i ochronę środowiska [12].

Terapia fagowa posiada szereg zalet, które czynią z niej obiecujące rozwiązanie dla problemu antybiooporności jak również alternatywę leczenia. Obligatoryjnie lityczne bakteriofagi niszczą bakterie, zaś część powszechnie wykorzystywanych antybiotyków działa tylko bakteriostatycznie. Ponadto, fagi mają zdolność do samonamnażania się co sprawia, że nie trzeba ich stosować w dużych ilościach, ani podawać kolejnych dawek dowymieniowo. Bakteriofagi mogą infekować określony gatunek, a nawet szczep bakterii. Dzięki temu nie wpływają na stan korzystnej mikrobioty. Dodatkowym atutem swoistości bakteriofagów względem infekowanych gospodarzy jest również to, że ogranicza ona możliwość powstania i szerzenia oporności. Oznacza to, że bakteriofagi nie wywierają presji selekcyjnej na bakterie niebędące ich gospodarzami [13].

Niektóre bakteriofagi mogą skutecznie lizować bakterie zorganizowane w struktury przylegające do powierzchni stałych, które otoczone są warstwą egzopolisacharydu tworzące tzw. biofilm [14]. Jest to możliwe dzięki temu, że bakteriofagi posiadają geny kodujące depolimerazy polisacharydów (DP). Są to enzymy degradujące otoczkowe i strukturalne polisacharydy, w tym także egzopolisacharydy (EPS), które są dominującym składnikiem powierzchni biofilmu. Depolimerazy polisacharydów mogą występować na płycie podstawowej faga bądź na jego włóknie. Mogą też występować w postaci wolnej, a ich wytwarzanie odbywa się konstytutywnie lub jest indukowane obecnością polisacharydu. Wytwarzanie przez bakterie biofilmu powoduje wiele problemów, ponieważ może być to struktura jedno- lub wielogatunkowa, która jest oporna na działanie wielu środków dezynfekcyjnych, a tym samym

trudna do usunięcia. Trudność ta wynika przede wszystkim z obecności wspomnianych wcześniej egzopolisacharydów. Ograniczają one dyfuzję substancji przeciwbakteryjnych do wnętrza biofilmu. W związku z tym zastosowanie fagoterapii do zwalczania bakterii tworzących biofilm ma ogromną przyszłość [15].

Dodatkową korzyścią w stosowaniu fagoterapii do zwalczania patogenów może być również fakt, że bakteriofagi są przyjazne dla środowiska [14]. Zaś jeśli chodzi o przemysłową produkcję preparatów fagowych to jest ona relatywnie prosta i tania, a odpady powstałe w trakcie produkcji są w większości biodegradowalne [13].

Swoistość bakteriofagów, która jest z jednej strony ogromną zaletą, uniemożliwia poniekąd zastosowania jednego faga do leczenia zakażeń wywołanych przez różne populacje bakterii. W wielu przypadkach konieczna może być dokładna identyfikacja czynnika etiologicznego i dobranie do niego odpowiedniego zestawu fagów tzw. koktajlu fagowego [11].

## 2.1. Wybrane bakteriofagi lityczne wobec szczepów wywołujących mastitis

Gronkowiec złocisty – *S. aureus* jest patogenem odpowiedzialnym za ok. 25-30% wszystkich infekcji wewnątrzwymieniowych i jako czynnik etiologiczny *mastitis* charakteryzuje się niskim wskaźnikiem wyleczalności. Wiele szczepów *S. aureus* posiada wysoką antybiotykooporność i zdolność do przetrwania w stadach w formie niewykrytej, głównie w zakażeniach subklinicznych. Terapia antybiotykowa zakażeń *S. aureus* podczas laktacji odznacza się wskaźnikiem wyleczalności na poziomie od 9% do 35%. Wzrastająca antybiotykooporność oraz niski poziom wyleczalności skłaniają do poszukiwania alternatywnych metod leczenia takich jak biokontrola z wykorzystaniem bakteriofagów litycznych wobec gronkowca [16].

Dotychczas wyizolowano i opisano kilka bakteriofagów przeciwko *S. aureus*. Jednym z nich jest bakteriofag SPW wyizolowany ze ścieków gospodarczych z lokalnej farmy krów mlecznych w Chinach. Charakterystyka morfologiczna z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego potwierdziła, że bakteriofag SPW należy do fagów ogonkowych typu T4 i rodziny *Myoviridae*. W badaniach Li i wsp. analiza specyficzności szczepowej bakteriofaga SPW wykazała, że infekuje on wszystkie z 39 izolatów metycylinyopornych *S. aureus* pozyskanych z próbek mleka od krów z klinicznymi objawami mastitis. Na podstawie przebiegu krzywej jednego cyklu namnażania określono parametry lityczne bakteriofaga SPW. Ustalono, że okres latencji bakteriofaga SPW trwa około 15 min a plon fagowy wynosi 44 pfu (ang. plaque-forming unit), czyli jednostek tworzących łyśinkę [17].

Poważnym problemem w terapii fagowej jest niekorzystny wpływ takich czynników jak pH, temperatura oraz promieniowanie UV [12]. W celu określenia czy bakteriofag SPW spełnia kryteria faga terapeutycznego zbadano jego stabilność chemiczną i fizyczną pod wpływem działania niekorzystnych czynników. Aktywność bakteriofaga SPW była stabilna w szerokim zakresie temperatur (40-60°C). Optimum aktywności wyznaczono na 37°C natomiast brak aktywności zanotowano dopiero w 70°C. Aktywność bakteriofaga SPW była stabilna również w szerokim zakresie pH. Bakteriofag SPW był aktywny przy pH w zakresie od 4 do 9 i utrzymywał zdolność lityczną po inkubacji w temperaturze 37°C przez okres do 1h w warunkach pH w zakresie od 2 do 10. Aktywność lityczna bakteriofaga SPW zmniejszała się nieznacznie poniżej pH 4 oraz powyżej pH 10. Skrajne zakresy pH

determinują żywotność bakteriofagów i mogą prowadzić do spadku aktywności litycznej poprzez uszkodzenie elementów strukturalnych faga. W związku z tym zdolność do przetrwania w szerokim zakresie wartości pH jest jedną z cech warunkującą możliwość wykorzystania bakteriofagów do celów terapeutycznych [17-18].

Kolejną równie ważną cechą jest wrażliwość bakteriofagów na promieniowanie UV. Promieniowanie UV jest jednym z głównych czynników drastycznie redukujących populację bakteriofagów w środowisku [18]. Li i wsp. badali wpływ promieniowania UV na przeżywalność bakteriofaga SPW. Otrzymany wynik sugeruje, że promieniowanie UV nie wpływa znacząco na przeżywalność bakteriofaga SPW, ponieważ aż 94% populacji bakteriofaga SPW przeżywa czterdziestominutową ekspozycję na promieniowanie UV. Aktywność bakteriobójczą faga SPW zbadano w teście *in vitro*. Płynną hodowlę *S. aureus* w logarytmicznej fazie wzrostu infekowano bakteriofagiem SPW tak aby współczynnik infekcji – MOI (ang. *multiplicity of infection*) wynosił odpowiednio 1 i 0,01. Po upływie 3h zaobserwowano wyraźne opóźnienie wzrostu bakterii. Po upływie 6h gęstość optyczna hodowli *S. aureus* spadła do wartości 0,025 a po 60h osiągnęła wartość bliską zerowej. Wyniki te świadczą o silnej aktywności bakteriobójczej faga SPW, co jest ważne w terapii fagowej [17].

Kolejnym opisanym bakteriofagiem przeciwko *S. aureus* jest bakteriofag MSA6 wyizolowany z próbek mleka pobranych od krów z klinicznymi objawami mastitis. Na podstawie obrazu z mikroskopu elektronowego potwierdzono, że bakteriofag MSA6 należy do fagów ogonkowych typu T4 i rodziny *Myoviridae*. Zakres lityczny faga MSA6 badano wobec szczepów *S. aureus* (wyizolowanych od ludzi, izolowanych z próbek mleka od krów z zapaleniem wymienia, izolatów z gleby), a także szczepów innych gronkowców *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus saprophyticus* (pozyskanych z kolekcji American Type Culture Collection). Bakteriofag MSA6 tworzył łąsinki na 26 z 27 testowanych szczepów MRSA. Dodatkowo wszystkie z 16 testowanych izolatów *S. aureus* z próbek mleka od krów z zapaleniem wymienia były wrażliwe na faga MSA6. Natomiast nie zaobserwowano strefy lizy dla szczepów *S. epidermidis* i *S. saprophyticus*. Te wyniki wskazują, że fag MSA6 ma bardzo szeroki zakres gospodarzy. Parametry lityczne bakteriofaga MSA6 charakteryzują się bardzo szybkim czasem adsorpcji oraz krótkim czasem latencji. Już w ciągu 5 min dochodzi do zaadsorbowania ponad 82% cząstek fagowych do komórek gospodarza a po 20 min wartość ta wzrasta do 98%. Okres latencji trwa zaledwie 15 min natomiast plon fagowy wynosi 23 pfu. Aktywność bakteriofaga MSA6 była stabilna w temperaturze 37°C i 50°C. Ponadto, utrzymywał zdolność lityczną w szerokim zakresie pH od 4 do 10 [19].

Analiza genomu bakteriofaga MSA6 wykazała brak miejsc restrykcyjnych dla endonukleaz Sau3AI, BamHI i BglII. Sau3AI jest enzymem wyizolowanym z *S. aureus*, który rozpoznaje krótką sekwencję palindromową GATC. Endonukleazy restrykcyjne BamHI i BglII rozpoznają odpowiednio sekwencje GGATCC i AGATCT. Brak miejsc GATC rozpoznawanych przez system restrykcyjny i system modyfikacji jest jedną ze strategii ewolucji bakteriofagów stosowaną do uniknięcia mechanizmów obrony bakterii przed infekcją obcym DNA [19]. Brak miejsc GATC w DNA bakteriofagów *Staphylococcus* potwierdza istnienie takiego mechanizmu unikania miejsc GATC [20]. Tak zmodyfikowane fagowe DNA jest wysoce odporne na enzymy restrykcyjne gospodarza [21]. Jest to dodatkowy atut bakteriofagów infekujących gronkowce, w tym faga MSA6, jako fagów terapeutycznych. Ogranicza

możliwość powstawania oporności komórek gospodarza i prowadzi do efektywnej lizy bakterii [22].

Nie wszystkie bakteriofagi nadają się do zastosowania w terapii. W szczególności nie nadają się do tego celu fagi łagodne, które zdolne są do wejścia w cykl lizogeniczny. Replikacja genomu takiego wirusa nie zabija bowiem gospodarza. Łagodne fagi *S. aureus* z rodziny *Siphoviridae* klasyfikuje się na podstawie ich aktywności litycznej, morfologii i właściwości serologicznych w sześciu grupach. Najważniejszymi grupami są fagi infekujące szczepy *S. aureus* izolowane od ludzi (serogrupa A), fagi podobne do faga 11 (serogrupa B), fagi podobne do faga 77 (serogrupa F) oraz fagi podobne do faga 187 (serogrupa L). Obligatoryjnie lityczne bakteriofagi *Staphylococcus* spp., podobne do faga T4, należą do serogrupy D, są członkami rodziny *Myoviridae* i nie wykazują pokrewieństwa z fagami łagodnymi [23]. Aby określić do jakiej grupy serologicznej należy bakteriofag MSA6 i tym samym wykluczyć jego zdolność do lizogenii, przeprowadzono reakcję PCR przy użyciu specyficznych starterów zaprojektowanych dla sekwencji kodującej strukturalne białka kapsydu, które są wspólne dla wszystkich dostępnych fagów typu T4. Produkt amplifikacji potwierdził przynależność faga MSA6 do grupy serologicznej D [19].

Charakterystyka morfologiczna z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego pokazała, że bakteriofagi SPW oraz MSA6 należą do fagów ogonkowych z rodziny *Myoviridae* (T4, K, G1), które z powodzeniem znalazły zastosowanie w terapii fagowej [24-25]. Zarówno bakteriofag SPW jak i MSA6 posiada silną aktywność lityczną przeciwko *S. aureus* oraz szeroki zakres gospodarzy. Analiza funkcjonalna obydwu bakteriofagów dowodzi, że posiadają silny potencjał lityczny. Z kolei analiza genetyczna bakteriofaga MSA6 wykazała, że należy do bakteriofagów gronkowcowych z grupy serologicznej D, które są fagami obligatoryjnie litycznymi nie wchodzącymi w cykl lizogeniczny [19]. Biorąc pod uwagę wyżej wymienione cechy można stwierdzić, że obydwie bakteriofagi mogą stać się skutecznym narzędziem w walce z infekcjami wywołanymi przez *S. aureus* zarówno jako samodzielne środki antybakteryjne jak i składniki tzw. koktajlu fagowego.

## 2.2. Koktajle fagowe

Badania z wykorzystaniem tzw. koktajli fagowych zaczęły zyskiwać popularność z uwagi na niedostateczne lub umiarkowane wyniki otrzymywane podczas oceny pojedynczych preparatów fagowych. Nie oznacza to, że nie zaobserwowano sukcesów w terapii pojedynczymi fagami, skupiono się raczej na poszukiwaniu strategii, która zintensyfikuje efektywność wykorzystania bakteriofagów w warunkach *in vivo*. Jedną z takich strategii jest formowanie fagów w koktajle. Formowanie koktajli fagowych można zróżnicować na dwie podstawowe koncepcje. Pierwsza z nich ma na celu poszerzenie spektrum litycznego preparatu fagowego. Druga koncepcja ma na celu zminimalizowanie ryzyka powstania bakterii opornych na infekcję fagiem podczas poszczególnych aplikacji. Obydwie koncepcje prowadzą do zwiększenia komercyjnego zastosowania koktajli fagowych [26, 27].

Koktajle fagowe mogą mieć szczególnie istotne znaczenie w przypadku zapalenia gruczołu mlekowego wywołanego przez pałeczkę *Escherichia coli*, znaną powszechnie jako pałeczka okrężnicy, która uznawana jest m.in. za oportunistyczny patogen środowiskowy. Szczepy izolowane od krów z zapaleniem gruczołu mlekowego, nawet z tej samej hodowli, bywają genetycznie zróżnicowane [28]. Dotychczas nie



zidentyfikowano specyficznych markerów genetycznych ani czynników wirulencji, które mogłyby odróżnić szczepy wywołujące mastitis od środowiskowych *E. coli* izolowanych z zakładów mleczarskich [29]. Dodatkowo wykazano, że ciężkie przypadki mastitis wywołane przez *E. coli*, z objawami ogólnymi utrzymującymi się od 3 do 5 dni są mało podatne na antybiotykoterapię. Dotyczy to głównie krów z wysoką wydajnością mleczną i niską liczbą komórek somatycznych w mleku [30]. W przypadku mastitis wywołanego przez *E. coli* rekomendowane jest zastosowanie celowanej terapii antybiotykowej. Jednakże prace badawcze pokazują, że nie wpływa ona znacząco na skuteczność leczenia klinicznych postaci mastitis o etiologii *E. coli* [31]. Przyczyn takiego stanu poszukiwano w sposobie podania i dystrybucji leku. Pyörälä i wsp. sprawdzili wpływ leczenia dowymieniowego w ciężkich przypadkach mastitis o podłożu *E. coli*. Antybiotyki skuteczne *in vitro* po aplikacji dowymieniowej nie poprawiały wskaźnika wyleczeń [32]. Nieskuteczność terapii antybiotykowej w przypadku mastitis wywołanych przez *E. coli* jest szczególnie problematyczna. Należy wziąć pod uwagę, że w przebiegu ostrym zapalenia istnieje możliwość wystąpienia bakteriemii, która stwierdzana jest u 32-45% zwierząt. Skutkiem bakteriemii może być śmierć zwierzęcia a przypadki padania dotyczą krów zarówno z bakteriamią, jak i bez niej [33-34].

Terapia wykorzystująca koktajle fagowe może być realną alternatywą dla antybiotyków [35]. Użycie wielu fagów w koktajlu zwiększa swoistość w zakresie tak genetycznie zróżnicowanego gospodarza jakim jest *E. coli* wywołujące mastitis. Podjęto próby stworzenia takiego koktajlu. Wyizolowano 74 bakteriofagi przy użyciu 36 izolatów *E. coli* pochodzących od krów z klinicznymi objawami mastitis z farm mlecznych w stanie Waszyngton. Każdy pojedynczy preparat faga był testowany pod kątem zdolności do hamowania wzrostu 36 klinicznych izolatów przy użyciu testów nakropieniowych. W oparciu o zróżnicowany zakres lizowanych szczepów mastitis z całej puli wyizolowanych bakteriofagów wybrano 4 fagi jako składniki koktajlu. Wielkość genomu tych fagów oszacowano między 140 a 172 kb po analizie za pomocą elektroforezy PFGE. Trzy z 4 genomów fagów były podatne na trawienie w standardowych warunkach przez EcoRV. Wzory restrykcyjne genomów fagowych były różne [36].

Wszystkie te wyniki wskazują, że każdy z uzyskanych preparatów fagowych zawierał pojedynczego bakteriofaga genetycznie różnego od pozostałych. Analiza sekwencji genomów potwierdziła, że koktajl zawierał 2 fagi podobne do faga T4, faga podobnego do bakteriofaga rV5 i faga podobnego do bakteriofaga phi92 [37]. Wszystkie 4 fagi były lityczne i nie zawierały genów, które sugerowałyby zdolność do lizogenii. Aktywność bakteriobójczą koktajlu zbadano w teście *in vitro*. Płynne hodowle 36 klinicznych szczepów *E. coli* infekowano koktajlem fagowym tak aby MOI wynosiło 100. Koktajl fagowy posiadał szerokie spektrum działania przeciwko badanym izolatom. Wzrost 21 z 36 szczepów *E. coli* był całkowicie lub częściowo zahamowany przez koktajl fagowy. Aby ocenić przydatność koktajlu do zwalczania środowiskowych szczepów *E. coli* przeprowadzono tę samą analizę na zbiorze 26 szczepów *E. coli* (wyizolowanych od krów z klinicznymi objawami mastitis z farm mlecznych ze stanu New York). W tym przypadku koktajl fagowy hamował wzrost 14 szczepów. Bakteriofagi izolowane przy użyciu pojedynczego szczepu klinicznego mogą nie być w stanie zainfekować różnych szczepów środowiskowych ze względu na wysoką specyficzność wobec gospodarza bakteryjnego. Koktajl zawierający 4 różne bakteriofagi wykazał podobną aktywność bakteriobójczą wobec szczepów

*E. coli* wywołujących *mastitis* wyizolowanych z dwóch geograficznie odrębnych farm mlecznych [36]. Stwarza to możliwość uniwersalnego zastosowania koktajlu bakteriofagowego do zapobiegania zapaleniu gruczołu mlekowego o podłożu etiologicznym *E. coli* w różnych farmach mlecznych.

Dodatkowo, aby koktajl fagowy był skuteczny w leczeniu lub zapobieganiu *mastitis*, oprócz szerokiego spektrum litycznego powinien być zdolny do lizy bakterii w obecności surowego mleka i wydzielin w okresie zasuszania. W swoich badaniach McLean i wsp. udowodnili, że można całkowicie wyeliminować *E. coli* przy pomocy fagów w surowym mleku w temperaturze inkubacji 25°C [38]. Wyzwaniem staje się stworzenie koktajlu fagowego umożliwiającego adsorpcję, replikację i lizę komórek *E. coli* w obecności mleka surowego w temperaturze fizjologicznej. Badano całkowitą liczbę komórek *E. coli* w surowym mleku. Po 12 godzinach inkubacji z koktajlem fagowym wzrost bakterii w porównaniu z kontrolą negatywną został znacząco zahamowany. Dochodziło do zmniejszenia liczby komórek tworzących kolonie o 3 jednostki logarytmiczne. Zmniejszenie to odpowiadało wzrostowi liczby jednostek tworzących łyśinki między 4 a 8 godziną inkubacji, co wskazuje na lizę komórek *E. coli* przez fagi [36].

### 3. Podsumowanie

Wzrost antybiotykooporności bakterii ma ogromne znaczenie w profilaktyce i leczeniu *mastitis* u krów wywołwanego głównie przez ziarniaki Gram-dodatnie i pałeczki kałowe. Szybkie rozprzestrzenianie się oporności wśród bakterii wywołujących tą jednostkę chorobową powoduje przedłużającą się terapię zwierząt [6, 7]. Nierzadko również wiąże się z dużymi stratami ekonomicznymi. Wielkie nadzieje upatruje się w terapii fagowej, czyli tzw. biokontroli zakażeń bakteryjnych z wykorzystaniem bakteriofagów. Jako naturalne komponenty biosfery mogą być izolowane z różnych środowisk. Obecnie największym problemem są zakażenia gronkowcowe i ich oporność na metycylinę, co w praktyce oznacza wykluczenie prawie wszystkich antybiotyków z grupy  $\beta$ -laktamów. Dotychczas wyizolowano i opisano kilka bakteriofagów przeciwko *S. aureus*, a jednym z pierwszych użytym w preparatach, był bakteriofag K [25]. Nowo wyizolowane bakteriofagi SPW oraz MSA6 i badania nad ich lityczną aktywnością, wobec tego patogenu są jeszcze bardziej obiecujące. Dodatkowo nabycie oporności przeciwko bakteriofagom jest mało prawdopodobne. Zmodyfikowane fagowe DNA jest odporne na enzymy systemu restrykcji i modyfikacji gospodarza [20]. Okresowe podawanie fagów może pomóc w wyeliminowaniu infekcji występujących u drobiu, myszy, królików i bydła mlecznego [39-41]. Na uwagę zasługuje fakt, że bakteriofagi poza specyficzną eliminacją patogenów nie wpływają na normalną mikrobiotę, a więc nie „wyjawiają” organizmu [13].

Za szereg zakażeń gruczołu mlekowego odpowiedzialne są również bakterie Gram-ujemne, głównie *E. coli*, a szczepy izolowane od krów są szeroko zróżnicowane genetycznie [28]. Podjęto próbę identyfikacji bakteriofagów, które mogłyby zostać użyte jako składniki tzw. koktajlu fagowego. Użycie wielu fagów w koktajlu poszerza spektrum lityczne preparatu zwiększając swoistość w zakresie szczepów *E. coli* izolowanych nawet z geograficznie odrębnych farm mlecznych. Stwarza to możliwość uniwersalnego wykorzystania koktajlu fagowego w profilaktyce zapalenia gruczołu mlekowego.

Zebrane informacje pozwalają jednoznacznie stwierdzić szereg zalet terapii fagowej, począwszy od ich swoistego działania, przez łatwość w produkcji, na nowych odkryciach kończąc. Ich zastosowanie nie tylko w medycynie ludzkiej, ale i w weterynarii nabiera na znaczeniu i stanowi alternatywę farmakoterapii. Dokładna charakterystyka potencjalnych fagów terapeutycznych zarówno pod względem funkcjonalnym jak i genetycznym, pozwoli na stworzenie preparatów fagowych, które mogą stać się istotnym i powszechnie wykorzystywanym środkiem w walce z bakteriami patogennymi.

## Literatura

1. Halasa T., Huijps K., Østerås O., Hogeveen H., *Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review*, The Veterinary Quarterly, 29, (2007), s. 18-31.
2. Heikkilä A. M., Nousiainen J. I., Pyörälä S., *Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling*, Journal of Dairy Science, 95, (2012), s. 139-150.
3. Kłossowska A., Malinowski E., *Drobnoustroje patogenne dla człowieka w mleku zbiorczym*, Medycyna Weterynaryjna, 57, (2001), s. 28-33.
4. Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Lesiak M., *Wrażliwość na antybiotyki laktamazo-dodatnich i laktamazo-ujemnych bakterii wyosobnionych z przypadków mastitis u krów*, Medycyna Weterynaryjna, 60, (2004), s. 176-180.
5. Smith G. W., Lyman R. L., Anderson K. K., *Efficacy of vaccination and antimicrobial treatment to eliminate chronic intramammary Staphylococcus aureus infections in dairy cattle*, Journal of the American Veterinary Medical Association, 228, (2006), s. 422-425.
6. Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A., Smulski S., Markiewicz H., Kaczmarowski M., *Etiological agents of dairy cows' mastitis in western part of Poland*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 9, (2006), s. 191-194.
7. Bradley A., *Bovine mastitis: an evolving disease*, The Veterinary Journal, 164, (2002), s. 116-128.
8. Fijałkowski K., Czernomysy-Furowicz D., Ferlas M., *Staphylococcus aureus kontra układ immunologiczny*, Postępy Mikrobiologii, 47, (2008), s. 497-501.
9. Philpot N.W., Nickerson S.C., *Zwyciężyć w walce z mastitis*, WestfaliaSurge, Polska 2006.
10. Fischetti V. A., *Bacteriophage lysins as effective antibacterials*, Current Opinion in Microbiology, 11 (5), (2008), s. 393-400.
11. Porter J., Anderson J., Carter L., Donjacour E., Paros M., *In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis*, Journal of Dairy Science, 99, (2016), s. 1-10.
12. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G., *Bacteriophage therapy*, Antimicrobial Agents Chemotherapy, 45(3), (2001), s. 649-59.
13. Loc-Carrillo C., Abedon S. T., *Pros and cons of phage therapy*, Bacteriophage, (2011), s. 111-114.
14. Harper D. R., Parracho H. M. R. T., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S., Morales S., *Bacteriophages and biofilms*, Antibiotics, 3, (2014), s. 270-284.
15. Maszewska A., *Fagowe depolimerazy polisacharydów – charakterystyka i zastosowanie*, Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej, 69, (2015), s. 690-702.
16. Wall J. R., Powell A. M., Paape M. J., Kerr D. E., Bannerman D. D., Pursel V. G., Wells K. D., Talbot N., Hawk H. W., *Genetically enhanced cows resist intramammary Staphylococcus aureus infection*, Nature Biotechnology, 23, (2005), s. 445-451.
17. Li L., Zhang Z., *Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle*, Molecular Biology Reports, 41, (2014), s. 5829-5838.
18. Jończyk E., Kłak M., Międzybrodzki R., Górski A., *The influence of external factors on bacteriophages—review*, Folia Microbiologica, 56, (2011), s. 191-200.

19. Kwiatek M., Parasion S., Mizak L., Gryko R., Bartoszcze M., Kocik J., *Characterization of a bacteriophage, isolated from a cow with mastitis, that is lytic against Staphylococcus aureus strains*, Archives of Virology, 157, (2012), s. 225-234.
20. O'Flaherty S., Coffey A., Edwards R., Meaney W., Fitzgerald G. F., Ross R. P., *Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting Gram-positive bacteria with a low G+C content*, Journal of Bacteriology, 186, (2004), 2862-2871.
21. Huang L. H., Farnet C. M., Ehrlich K. C., Ehrlich M., *Digestion of highly modified bacteriophage DNA by restriction endonucleases*, Nucleic Acids Research, 10, (1982), s. 1579-1591.
22. Samson J. E., Magadán A. H., Sabri M., Moineau S., *Revenge of the phages: defeating bacterial defences*. Nature Reviews Microbiology, 11, (2013), s. 675-87.
23. Pantucek R., Doskar J., Ruzickova V., Kaspárek P., Oracova E., Kvardova V., Rosypal S., *Identification of bacteriophage types and their carriage in Staphylococcus aureus*, Archives of Virology, 149, (2004), s. 1689-1703.
24. Merabishvili M., Pirnay J. P., Verbeken G., Chanishvili N., Tediashvili M., Lashkhi N., Glonti T., Krylov V., Mast J., Van Parys L., Lavigne R., Volckaert G., Mattheus W., Verween G., De Corte P., Rose T., Jennes S., Zizi M., De Vos D., Vaneechoutte M., *Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials*, PLoS ONE, 4, (2009), e4944.
25. O'Flaherty S., Ross R. P., Meaney W., Fitzgerald G. F., Elbreki M. F., Coffey A., *Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals*, Applied and Environmental Microbiology, 71, (2005), s. 1836-1842.
26. Skurnik M., Strauch E., *Phage therapy: facts and fiction*, International Journal of Medical Microbiology, 296 (1), (2006), s. 5-14.
27. Carlton R. M., *Phage therapy: past history and future prospects*, Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 47(5), (1999), s. 267-274.
28. Moser A., Stephan R., Corti S., Lehner A., *Resistance profiles and genetic diversity of Escherichia coli strains isolated from acute bovine mastitis*, Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde, 155, (2013), s. 351-357.
29. Wenz, J. R., Barrington G. M., Garry F. B., Ellis R. P., Magnuson R. J., *Escherichia coli isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes and clinical coliform mastitis severity*, Journal of Dairy Science, 89, (2006), s. 3408-3412.
30. Lohuis J., Hensen S., Pavicic M., *The balance of forces in pathogenesis and therapy of mastitis*, [w:] Zecconi A. (red.), IDF Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland, Stresa 2000, s. 298-306.
31. Lehtolainen T., Shwimmer A., Shpigel N., Honkanen-Buzalski T., Pyörälä S., *In vitro antimicrobial susceptibility of Escherichia coli isolates originating from clinical mastitis in Finland and Israel*, Journal of Dairy Science, 86, (2003), s. 3927-3932.
32. Pyörälä S., Kaartinen L., Käck H., Rainio V., *Efficacy of two therapy regiment for treatment of experimentally induced Escherichia coli mastitis in cows*, Journal of Dairy Science, 77, (1994), s. 453-461.
33. Cebra C., Garry F., Dinsmore R., *Naturally occurring acute coliform mastitis in Holstein cattle*, Journal of Veterinary Internal Medicine, 10, (1996), s. 252-257.
34. Wenz J., Barrington G., Garry F., McSweeney K., Dinsmore R., Goodell G., Callan R., *Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows*, Journal of the American Veterinary Medical Association, 7, (2001), s. 976-981.
35. Tsonos, J., Vandenheuvel D., Briers Y., De Greve H., Hernalsteens J. P., Lavigne R., *Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters*, Veterinary Microbiology, 171, (2014). s. 460-469.
36. Porter J., Anderson J., Carter L., Donjacour E., Paros M., *In vitro evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis* Journal of Dairy Science, 99, (2015), s. 1-10.

37. Kropinski A. M., Waddell T., Meng J., Franklin K., Ackermann H. W., Ahmed R., Mazzocco A., Yates J., Lingohr E. J., Johnson R. P., *The host-range, genomics and proteomics of Escherichia coli O157:H7 bacteriophage rV5*, *Virology Journal*, 10, (2013), s. 76-87.
38. McLean S. K., Dunn L. A., Palombo E. A., *Phage inhibition of Escherichia coli in ultrahigh-temperature-treated and raw milk*, *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, (2013), s. 956-962.
39. Capparelli R., Parlato M., Borriello G., Salvatore P., Iannelli D., *Experimental phage therapy against Staphylococcus aureus in mice*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(8), (2007), s. 2765-2773.
40. Atterbury R. J., Van Bergen M. A., Ortiz F., Lovell M. A., Harris J. A., De Boer A., Wagenaar J. A., Allen V. M., Barrow P. A., *Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens*, 73(14), (2007), *Applied and Environmental Microbiology*, s. 4543-4549
41. Wills Q. F., Kerrigan C., Soothill J. S., *Experimental bacteriophage protection against Staphylococcus aureus abscesses in a rabbit model*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), (2005), s. 1220-1221.

## Potencjalne wykorzystanie bakteriofagów w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych wywołujących mastitis

### Streszczenie

*Mastitis* stanowi główną przyczynę strat ekonomicznych w hodowli krów mlecznych. Kontrola zakażeń bakteryjnych je wywołujących jest trudna z uwagi na rozprzestrzenianie i selekcję szczepów wielolekoopornych. Alternatywę w profilaktyce i leczeniu stanowi może terapia fagowa. Bakteriofagi wydają się być skuteczniejsze w niszczeniu patogenów niż powszechnie używane antybiotyki i chemioterapeutyki. Ponadto, nie trzeba ich stosować w dużych ilościach ani podawać kolejnych dawek dowymieniowo, ponieważ mają zdolność do samonamnażania się. Infekują określony gatunek, a nawet szczep bakterii nie wpływając na stan korzystnej mikrobioty co ogranicza możliwość szerzenia oporności. Dodatkowo zminimalizowanie tego ryzyka przy infekcji fagiem można osiągnąć stosując tzw. koktajle fagowe. Jest to szczególnie ważne w przypadku zakażeń gruczołu mlekowego charakteryzujących się niskim poziomem wyleczalności lub wywołanych przez patogeny oportunistyczne. Ponadto, użycie wielu fagów w jednym preparacie zwiększa zakres lityczny. Pozwala to na uniwersalne wykorzystanie koktajlu fagowego w różnych farmach mlecznych w odległych szerokościach geograficznych.

Słowa kluczowe: mastitis, terapia fagowa, antybiotykooporność, koktajl fagowy.

## Potential use of bacteriophages for prevention and treatment of bacterial infections that cause mastitis

### Abstract

*Mastitis* in dairy cattle continues to be an economically important disease. However, control is complicated by a high prevalence and spread of multi-drug resistant strains. Phage therapy, therefore, is considered as an alternative way of controlling bacterial infections and contaminations. Bacteriophages seem to be more effective in destroying pathogens than commonly used antibiotics and chemotherapeutics. In addition, they do not need to be used in large quantities or given subsequent intramammary doses, because they have the ability to self-propagate. Bacteriophages infect a specific species, and even a bacterial strain, without affecting natural microbiota, which limits the possibility of spreading resistance. In addition, limiting this risk can be achieved by using phage cocktails. This is particularly important in the case of mammary gland infections characterized by low levels of curability or induced by opportunistic pathogens. In addition, the use of multiple phages in one formulation increases the lytic range. This allows the universal use of phage cocktails in various dairy farms located at distant regions.

Keywords: mastitis, phage therapy, antibiotic resistance, phage cocktail.

# Skuteczność procesu sterylizacji w układzie przepływowym, dla zmiennej konfiguracji lamp UVC, przy wykorzystaniu bakterii *Micrococcus luteus*

## 1. Wstęp

Według PN-EN 12792:2006 za jakość powietrza wewnętrznego uważa się te cechy powietrza niezbędnego do oddychania wewnątrz budynku, które obejmują skład gazowy, wilgotność, temperaturę i zanieczyszczenia [1].

Zarówno w powietrzu zewnętrznym, jak i wewnętrznym, poza składnikami, które stanowią właściwy i niezmienny skład powietrza, znajduje się wiele elementów niepożądanych, stanowiących wspomniane w normie zanieczyszczenie [2]. Pod pojęciem zanieczyszczenia powietrza rozumie się obecność w atmosferze substancji, powstających w wyniku działania człowieka lub procesów naturalnych, przy czym substancje te występują w stężeniach i w czasie wystarczającym do niekorzystnego wpływu na komfort, zdrowie i dobra materialne osób oraz stan środowiska [3]. Jeżeli emisja zanieczyszczeń i ich toksyczność są niewielkie, to w skutek m.in. sedimentacji, asymilacji lub degradacji następuje ich inaktywacja. Niestety bardzo często wspomniane procesy nie są w stanie powstrzymać naruszenia równowagi środowiskowej. Można stwierdzić, że problem deficytu powietrza nie istnieje, jednak obawiać się można pogarszającej się jego jakości [4].

Jednym z elementów mających istotny wpływ na jakość powietrza jest obecność zanieczyszczeń aerozolowych i bioaerozolowych (bioaerozol – zawieszone w powietrzu cząstki pochodzenia biologicznego [5]) pochodzenia roślinnego, zwierzęcego czy mineralnego. Bioaerozole stanowią różnorodną mieszaninę stałych lub ciekłych cząstek aerozolowych składających się m.in. z materiału biologicznego (wirusy, bakterie, zarodniki grzybów, fragmenty grzybni itp.) [6], produktów ich metabolizmu (endotoksyny, enterotoksyny, enzymy, mykotoksyny [7-9] lub pyłków kwiatowych, szczątków roślin, łupieżu zwierzęcego, naskórka zwierzęcego i ludzkiego [10]. Bioaerozol mogą również stanowić pojedyncze komórki bakteryjne w rozmiarze cząstek aerozolowych 0,5-2,0 µm np. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Arthro-bacter*. Podobnie zarodniki grzybów pleśniowych *Aspergillus fumigatus* (2,5-5,0 µm), *Trichoderma harizanum* (2,8-3,2 µm) *Aspergillus niger* (3,0-4,5 µm), *Clado-sporium macrocarpum* (5-8 µm) i *Penicillium brevicompactum* (7-17 µm) [11-13].

Zanieczyszczenie powietrza drobnoustrojami w pomieszczeniach zamkniętych pochodzi zarówno ze źródeł wewnętrznych, jak i z powietrza atmosferycznego (endogenne i egzogenne). Podstawowym źródłem mikroorganizmów w pomieszczeniach zamkniętych jest użytkownik i jego mikroflora z górnych dróg oddechowych, mikroorganizmy ze złuszczonego naskórka, pył bakteryjny (z podłóg, ubrań

<sup>1</sup> s.dumala@pollub.pl; Zakład Jakości Powietrza Wewnętrznego i Zewnętrznego, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Lubelska, www.wis.pollub.pl.

itp.) i zarodniki grzybów domowych. Siedlisko mikroorganizmów mogą stanowić przegrody budowlane, przedmioty znajdujące się w pomieszczeniu, wykończenia posadzek, kurz, systemy wentylacyjne. Bioaerozole przenoszą się wraz z ruchem ludzi i zwierząt oraz pod wpływem prądów powietrznych w pomieszczeniu. Zanieczyszczenia biologiczne powietrza wewnętrznego są w mniejszym stopniu narażone na działanie czynników meteorologicznych czy też promieniowanie UV, dlatego ich okres przeżywalności i liczebność nie podlegają wahaniom sezonowym, jak w przypadku mikroorganizmów występujących w powietrzu zewnętrznym. Stabilniejszy jest również skład gatunkowy. Spośród grzybów dominują przedstawiciele rodzajów *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* [14-16].

W Polsce brak jest zaleceń związanych z kryterium oceny narażenia na czynniki biologiczne, wartościami referencyjnymi czy zaleceniami metodycznymi dla powietrza wewnętrznego w budynkach mieszkalnych. Z uwagi na nieregulowane krajowe akty prawne w celu oceny środowiska wewnętrznego należy odnosić się do arbitralnych wartości normatywnych, które są przeważnie wyznaczane w oparciu o analizę dostępnych w piśmiennictwie badań prowadzonych przez badaczy na przestrzeni kilku lat. Określają dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń w danych środowiskach.

Środowisko wewnętrzne może być kształtowane w sposób pasywny lub aktywny. Pasywne metody oczyszczania powietrza to między innymi wprowadzanie roślin do pomieszczeń, stosowanie materiałów o właściwościach sorpcyjnych lub powierzchni pokrytych materiałami umożliwiającymi katalityczną degradację zanieczyszczeń [17]. Środkami aktywnymi zapobiegającymi zagrożeniom zdrowotnym związanym z zanieczyszczeniami powietrza wewnętrznego jest likwidowanie ich bezpośrednich źródeł, odpowiednia wentylacja, filtracja czy sterylizacja wykorzystująca właściwości dezynfekcyjne promieniowania UV, proces fotokatalizy lub ozonowanie.

Bakteriobójcze właściwości promieniowania ultrafioletowego znane są już od dawna. W 1877 roku Downes i Blunt zaobserwowali, że promieniowanie słoneczne przyczyniało się do zahamowania rozwoju drobnoustrojów [18]. Początkowo używane przede wszystkim w medycynie do dezynfekcji narzędzi i pomieszczeń później zaczęto stosować do sterylizacji wody oraz powietrza. Działanie bakteriobójcze promieniowania ultrafioletowego polega na uszkodzaniu struktur nukleinowych drobnoustrojów, dzięki czemu tracą one możliwość rozmnażania się oraz roznoszenia chorób [19].

Liczne badania potwierdzają, że promieniowanie UVC skutecznie unieczynnia wirusy, komórki bakterii i zarodniki [20-23]. Uważa się, że promieniowanie UVC jest skuteczniejsze w likwidowaniu zarodników zarówno pigmentowanych, jak i niepigmentowanych niż UVB (290-310 nm), czy UVA (320-400 nm) [24]. Lampy UVC okazały się również skuteczne przy oczyszczaniu powietrza wewnętrznego zanieczyszczonego zarodnikami grzybów oraz bakteryjnymi komórkami wegetatywnym [25, 26].

Za najskuteczniejszy zakres długości fal ultrafioletowych stosowanych przy niwelowaniu zanieczyszczeń mikrobiologicznych uważa się zakres 220-300 nanometrów (nm), natomiast najwyższą skuteczność oszacowano na 265 nm.

Z uwagi na rosnące zainteresowanie biobójczymi właściwościami lamp UVC, postanowiono przeanalizować wpływ ułożenia lamp na skuteczność procesu sterylizacji powietrza. Badania przeprowadzono w układzie przepływowym, dla bakterii *Micrococcus luteus* i dwóch konfiguracji lamp – prostopadłej i równoległej względem przepływającego strumienia powietrza.

## 2. Metoda badawcza

W oparciu o zalecenia podane przez ASHRAE Standard 52.2-2007 „*Method of Testing General Ventilation Air-Cleaning Devices for Removal Efficiency by Particle Size*” dotyczące określenia zdolności urządzeń do usuwania zanieczyszczeń z powietrza oraz ich odporność na przepływ powietrza, zbudowano układ składający się z trzech identycznych modułów (rys 1). Każdy z modułów pozwala na utrzymanie strumienia powietrza w zakresie 0-800 m<sup>3</sup>/h, temperatury powietrza nawiewanego +15-40°C oraz wilgotności względnej 30-70%.

Do badań wykorzystano szczep bakterii *Micrococcus luteus* Gram-dodatnie, nieruchliwe, nie tworzące spor kuliste komórki (ziarenkowce), tworzące kolonie w formie pakietów. Bakteria rośnie w warunkach tlenowych. Optymalny zakres temperatury dla wzrostu wynosi 25-37°C. *Micrococcus luteus* jest jednym z najczęściej izolowanych drobnoustrojów w trakcie monitoringu środowiska produkcyjnego w zakładach przemysłu farmaceutycznego. Bakteria ta stanowi naturalną florę fizjologiczną skóry człowieka, szczególnie głowy, rąk i nóg. Bakteria katalazo – dodatnia. Odporna na enzym lizostafinę, odpowiedzialną za degradację ściany komórkowej bakterii. Rozkłada zawiązki w pocie, w tym produkujące nieprzyjemne zapachy. Ma również zdolność rozkładu zanieczyszczeń, takich jak benzyna [27, 28].

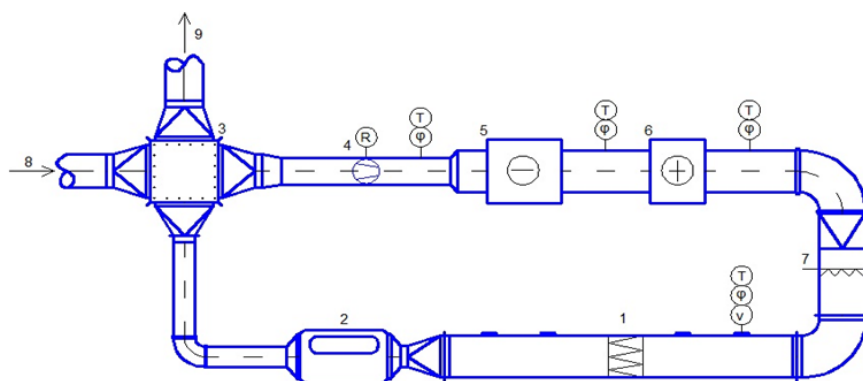
Próbki powietrza pobierano za pomocą impaktorów jednopoziomowych. Czas poboru wynosił 10 min. Mikroorganizmy zbierano na płytki Petriego z odpowiednim podłożem mikrobiologicznym. W przypadku bakterii wykorzystano typowy agar sojowy. Płytki inkubowano 48h w 36±1°C. Po zakończonym okresie inkubacji przeprowadzono analizę ilościową polegającą na zliczeniu i skorygowaniu w oparciu o tabele korelacji Andersena. Następnie stężenie policzono w jtk – jednostkach tworzących kolonie na podłożu stałym w 1 m<sup>3</sup> pobranego powietrza [jtk/m<sup>3</sup>].

Impaktory jednopoziomowe umieszczono za generatorem bioaerozolu, przed modułem UVC oraz za modułem. Aerozol bakteryjny generowano za pomocą generatora aerozolu ATM 226 (TOPAS). Badania powtórzono trzykrotnie. Zbadano dwa modele modułu dezynfekującego z lampami UVC – z i bez zaburzacza przepływu.

Każdy pomiar poprzedzony był tzw. ślepą próbą, podczas której lampy UVC oraz generator wyłączano.

Badania przeprowadzono dla dwóch ustawień lamp – prostopadle i równolegle względem przepływu powietrza.





Rysunek 1. Schemat układu pomiarowego z komorą ekspozycyjną, 1 – komora z wymiennym pakietem filtrów, 2 – sterylizator UV (rys 4.5), 3 – wymiennik krzyżowy, 4 – wentylator, 5 – chłodnica powietrza, 6 – nagrzewnica powietrza, 7 – nawilżacz ultradźwiękowy, 8 – doprowadzenie powietrza wentylacyjnego, 9 – odprowadzenie powietrza wentylacyjnego [opracowanie własne]

### 3. Analiza wyników

Wyniki pierwszej serii pomiarowej, w której zweryfikowano lokalizację punktów poboru, sposób generowania roztworu z badanym szczepem, aparaturę wykorzystaną w eksperymencie, zestawiono w tabeli 1. Wyniki wskazują, iż poprawnie zaplanowano przebieg badania. W czterech punktach pomiarowych uzyskano spodziewane wyniki stężenia bakterii przy wyłączonym module dezynfekującym UVC.

Wyniki drugiej serii pomiarowej (układ równoległy względem strumienia powietrza, 100 m<sup>3</sup>/h) zestawiono w tabeli 2. Dwie konstrukcje modułu, z i bez zaburzacza przepływu, osiągnęły skuteczność wyższą niż 99%. Po przejściu przez moduł liczba wygenerowanych bakterii z 10 950 jtk/m<sup>3</sup> spadła do wartości równej lub niższej od 21 jtk/m<sup>3</sup>. Uzyskano podobne wyniki w kolejnych trzech powtórzeniach.

Na rysunku 2 i 3 przedstawiono natomiast zmianę stężenia bakterii *Micrococcus luteus* dla przepływu powietrza wynoszącego 100 m<sup>3</sup>/h i dwóch konstrukcji modułu – bez i z zaburzaczem, w układzie prostokątnym względem strumienia powietrza. Uzyskano lepszy efekt sterylizacji dla modułu wyposażonego w zaburzacz. Stężenie bakterii malało wraz ze zwiększaniem natężenia promieniowania. Nie osiągnięto jednak pełnego wyjałowienia powietrza.

Tabela 1. Pierwsza seria pomiarowa z wyłączonymi lampami UVC, w układzie równoległym względem strumienia powietrza [opracowanie własne]

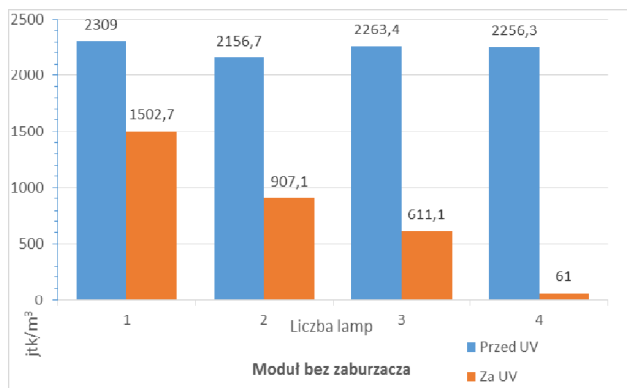
Seria	Czas min.	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]
		Punkt pomiarowy przed generatorem		Punkt pomiarowy za generatorem		Punkt pomiarowy przed modulem z lampami UVC		Punkt pomiarowy za modulem z lampami	

								UVC	
		1		2		3		4	
1	5	114	558	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950
2	5	158	837	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950
3	5	113	554	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950
1	10	254	1679	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950
2	10	258	1725	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950
3	10	264	1800	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950

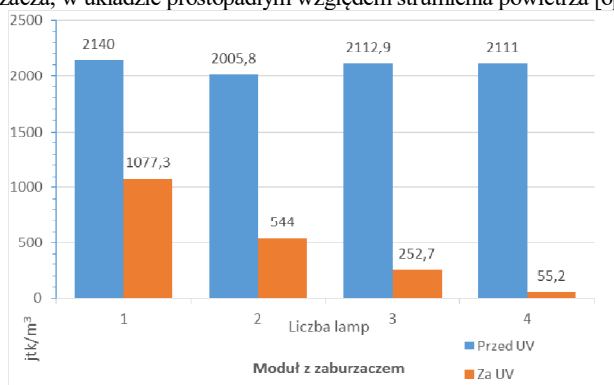
Uzyskane wyniki pozwoliły oszacować skuteczność procesu sterylizacji mieszcząca się w granicach 49,7% – 97,4% dla modułu bez zaburzacza oraz 34,9 – 97,3 dla modułu z zaburzaczem (rysunek 4 i 5). Skuteczność rosła wraz z ilością aktywnych lamp. Wartość maksymalną uzyskano dla włączonych 4 lampach, przy czym dla obydwu konstrukcji modułu oszacowano ją powyżej 97%.

Tabela 2. Druga seria pomiarowa z włączonymi lampami UVC, w układzie równoległym względem strumienia powietrza [opracowanie własne]

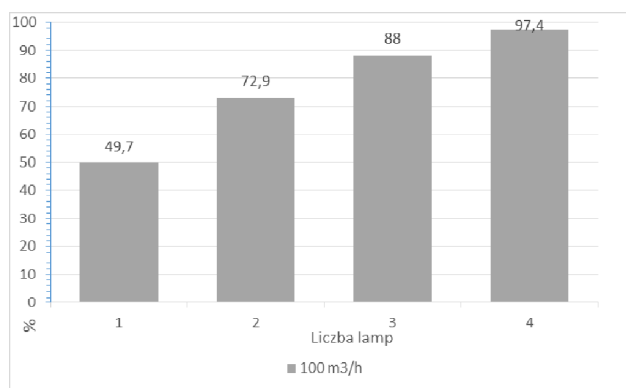
Seria	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]	Liczba kolonii	Stężenie [jtk/m <sup>3</sup> ]
	Punkt pomiarowy przed generatorem		Punkt pomiarowy za generatorem		Punkt pomiarowy przed modułem z lampami UVC		Punkt pomiarowy za modułem z lampami UVC	
	1	2	3	4				
Lampy UVC z zaburzaczem								
1	1	4	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	1	4
2	0	0	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	0	0
3	3	12	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	3	12
Lampy UVC bez zaburzacza								
1	3	12	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	3	12
2	1	4	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	5	21
3	0	0	>400	ok. 10950	>400	ok. 10950	4	16



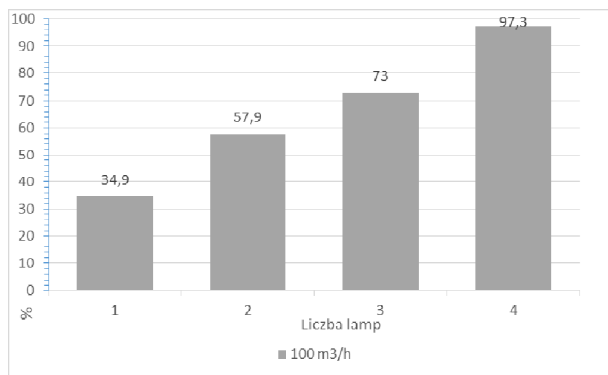
Rysunek 2. Liczba bakterii *Micrococcus luteus* dla przepływu powietrza wynoszącego 100 m<sup>3</sup>/h i konstrukcji modułu bez zaburzacza, w układzie prostopadłym względem strumienia powietrza [opracowanie własne]



Rysunek 3. Liczba bakterii *Micrococcus luteus* dla przepływu powietrza wynoszącego 100 m<sup>3</sup>/h i konstrukcji modułu z zaburzaczem, w układzie prostopadłym względem strumienia powietrza [opracowanie własne]



Rysunek 4. Skuteczność dezynfekcji lampami UVC w układzie prostopadłym względem strumienia powietrza, moduł bez zaburzacza [opracowanie własne]



Rysunek 5. Skuteczność dezynfekcji lampami UVC w układzie prostopadłym względem strumienia powietrza, moduł z zaburzaczem [opracowanie własne]

#### 4. Wnioski

Przeprowadzone badania pozwoliły na sformułowanie wniosków:

1. Moduł z lampami UVC w układzie równoległym względem strumienia powietrza uzyskał niemalże 100% skuteczność w procesie dezynfekcji niezależnie od ilości lamp.
2. Moduł z lampami UVC, bez zaburzacza, w układzie prostopadłym względem strumienia powietrza wykazał skuteczność: 49,7% dla 1 aktywnej lampy, 72,9% dla 2 lamp, 88% dla 3 lamp i 97,4% dla 4 lamp.
3. Konstrukcja modułu z zaburzaczem przepływu nie wpłynęła na poprawę skuteczności procesu dezynfekcji.

#### Literatura

1. PN-EN 12792:2006 – wersja polska, *Wentylacja budynków – Symbole, terminologia i oznaczenia na rysunkach*.
2. Dumala S., Dudzińska M., *Selected Heavy Metals in Settled Dust from Apartments Located in Lublin, Poland*, Annual Set The Environment Protection, Volume 17, (2015), s.410-421.
3. PN-ISO 4225:1999 – wersja polska, *Jakość powietrza – Zagadnienia ogólne – Terminologia*.
4. Chmiel M., Frączek K., Grzyb J., *Problemy monitoringu zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza*, Water-Environment-Rural Areas I–II, (2015), s.17–27.
5. PN-EN 14031:2006 – wersja polska, *Powietrze na stanowiskach pracy – Oznaczanie endotoksyn zawieszonych w powietrzu*.
6. An H.R., Mainelis G., Yao M., *Evaluation of a high-volume portable bioaerosol sampler in laboratory and field environments*, Indoor Air 14(6), (2004), s.385-393.
7. Law A.K.Y., Chau C.K., Chang G.Y.S., *Characteristics of bioaerosol profile in office buildings in Hong Kong*, Building and Environment 36, (2001), s. 527-541.
8. Agranovski I.E., Agranowski V., Reponen T., Willeke K., Grinshupun S.A., *Development and evaluation of a new personal sampler for culturable airborne microorganisms*, Atmospheric Environment 36, (2002), s.889-898.
9. Dudzińska M.R., *Aerozole w powietrzu wewnętrznym*, Monografia 112, Polska Akademia Nauk, Komitet Inżynierii Środowiska 2013.

10. Maus R., Goppelsroder A., Umhauer H., *Survival of bacterial and mold spores in air filter media*, Atmospheric Environment 35, (2001), s.105-113.
11. Bonetta S.A., Bonetta S.I., Mosso S., Sampo S., Carraro E., *Assessment of microbiological indoor air quality in an Italina office building equipped with HAVAC system*, Environmental Monitoring Assessment 161, (2009), s.473-483.
12. Menetrez M. Y., Foarde K.K., Dean T.R., Betancourt D.A., Moore S.A., *An evaluation of the protein mass of particulate matter*, Atmospheric Environment 41, (2007), s.8264-8274.
13. Dudzińska M.R., *Aerозole w powietrzu wewnętrznym*, Monografia 112, Polska Akademia Nauk, Komitet Inżynierii Środowiska 2013.
14. Cabral J.P.S., *Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions*, Science of the Total Environment, Vol. 408, (2010), s. 4285-4295.
15. Flannigan B., Samson R.A., Miller J.D., *Microorganisms in home and indoor work environments. Diversity, health impacts, investigation and control*. Wyd. 2. Londyn. CRC Press, (2011), s. 539.
16. Oszańca K. (red.), *Problemy w ochronie środowiska w województwie opolskim w latach 2010-2020*, Opolskie Ekoforum. Atmoterm S.A., (2010), s.203-222.
17. Sowa J., 2009, *Wpływ roślin na jakość powietrza w pomieszczeniach*, Ciepłownictwo, Ogrzewnictwo, Wentylacja, 10, (2009), s. 47-52.
18. Reed N.G., *The History of Ultraviolet Germicidal Irradiation for Air Disinfection*, Public Health Rep. Jan-Feb; vol. 125, (2010), s. 15-27.
19. Kałuska I., Stuglik Z., *Radiacyjna sterylizacja sprzętu medycznego*, Warszawa (1996).
20. Caillet-Fauquet, P., Di Giambattista, M., Draps, M., Sandras, F., Branckaert, T., de Launoit, Y. and Laub, R., *Continuous-flow UVC irradiation: a new, effective, protein activity-preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19*, J Virol Methods 118, (2004), s. 131-139.
21. Taghipour, F., *Ultraviolet and ionizing radiation for microorganism inactivation*, Water Res 38, (2004), s. 3940-3948.
22. Blatchley, E.R. III, Meeusen, A., Aronson, A.I. and Brewster, L., *Inactivation of Bacillus spores by ultraviolet or gamma radiation*, J Environ Eng 9, (2005), s. 1245-1252.
23. Koivunen, J., Heinonen-Tanski, H., *Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments*, Water Res 39, (2005), s. 1519-1526.
24. Moeller, R., Horneck, G., Facius, R. and Stackebrandt, E., *Role of pigmentation in protecting Bacillus sp. endospores against environmental UV radiation*, FEMS Microbiol Ecol 51, (2005), s. 231-236.
25. Cundith, C.J., Kerth, C.R., Hones, W.R., McCaskey, T.A. And Kublers, D.I., *Air-cleaning system effectiveness for control of airborne microbes in a meat-processing plant*, J Food Sci 67, (2002), s. 1170-1174.
26. Kujuvdzic, E., Matalkah, F., Howard, C.J., Hernanadez, M., Miller, S.L., *UV air cleaners and upper-room air ultraviolet germicidal irradiation of controlling airborne bacterial and fungal spores*, J Occup Environ Hyg 3, (2006), s.536-546.
27. Becker, K., von Eiff, C., *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*, Manual of Clinical Microbiology (10th ed., Vol. 1, pp.), (2011), s. 692-713.
28. Jyothi K., *Identification and Isolation of Hydrocarbon Degrading Bacteria by Molecular Characterization*, Helix Vol 2, (2012), s. 105-111.

## **Skuteczność procesu sterylizacji w układzie przepływowym, dla zmiennej konfiguracji lamp UVC, przy wykorzystaniu bakterii *Micrococcus luteus***

### Streszczenie

W powietrzu, poza składnikami stanowiącymi jego niezmienny skład, znajduje się wiele elementów niepożądanych, m.in. zanieczyszczenia. Środkami aktywnymi zapobiegającymi zagrożeniom zdrowotnym związanych z ich obecnością jest likwidowanie źródeł emisji, odpowiednia wentylacja, filtracja, sterylizacja wykorzystująca właściwości dezynfekujące promieniowania UVC, proces utleniania fotokatalitycznego lub ozonowanie.

Liczne badania potwierdzają, że promieniowanie UVC unieczynnia wirusy, komórki bakterii i zarodniki grzybów. Skuteczność procesu zależy od natężenia światła, czasu ekspozycji oraz długości fali. W literaturze odnaleźć możemy wiele prac związanych z wykorzystaniem UVC do usuwania zanieczyszczeń z powierzchni lub powietrza. Badacze koncentrowali się w nich między innymi na określeniu skuteczności procesu na wybranych szczepach bakterii, czy badaniu wpływu wybranych czynników na żywotność i moc lamp (wiek, cykle włączania i wyłączania, temperatura otoczenia i prędkość powietrza, wilgotność). Z uwagi na coraz szersze zastosowanie lamp w układach przepływowych, kolejnym parametrem wpływającą na skuteczność procesu sterylizacji UVC okazał się sposób ich montażu względem strumienia powietrza.

W pracy przedstawiono wpływ ułożenia lamp na proces sterylizacji powietrza. Badania przeprowadzono w układzie przepływowym, dla bakterii *Micrococcus luteus* i dwóch konfiguracji lamp – prostopadłej i równoległej względem przepływającego strumienia powietrza.

Słowa kluczowe: promieniowanie ultrafioletowe, UVC, sterylizacja, *Micrococcus luteus*.

## **Effectiveness of the sterilization process in the flow system, for variable configuration of UVC lamps, using *Micrococcus luteus* bacteria**

### Abstract

In the air, apart from the components constituting its unchanging composition, there are many undesirable elements, including pollution. The active measures that prevent health risks related to their presence are the elimination of emission sources, adequate ventilation, filtration, sterilization using UVC disinfectant properties, photocatalytic oxidation or ozonation.

Studies confirm that UVC radiation inactivates viruses, bacterial cells and fungal spores. The effectiveness of the process depends on the intensity of light, the time of exposure and the wavelength. In the literature, we can find many studies on the use of UVC to remove impurities from surfaces or air. Researchers focused on the effectiveness of disinfection in selected bacterial strains, or the influence of selected factors on the life and power of lamps (age, on and off cycles, ambient temperature and air speed, humidity). Due to the increasing use of lamps in flow systems, another parameter affecting the efficiency of the UVC sterilization process was the method of their assembly in relation to the air stream.

The paper presents the effect of lamp placement on the air sterilization process. The tests were carried out in a flow system, for *Micrococcus luteus* bacteria and two lamp configurations – perpendicular and parallel to the air flow.

Keywords: ultraviolet radiation, UVC, sterilization, *Micrococcus luteus*.

## Indeks Autorów

Adamek E. ....	7
Baran W. ....	7
Bonio K. ....	77
Cel W. ....	34
Chudzik B. ....	77
Dołhańczuk-Śródka A. ....	61, 91
Duda S. M. ....	34
Dulian P. ....	43
Dumała S. M. ....	110
Gagoś M. ....	77
Greczek-Stachura M. ....	43
Gruca A. ....	43
Jackowski M. ....	69
Jaglarz J. ....	43
Jurkowski A. ....	52
Karasiewicz-Urbańska M. ....	100
Kierpiec M. ....	52
Kozioł J. J. ....	52
Lech M. ....	69
Nabrdalik M. ....	61, 91
Niewiadomy A. ....	77
Orwat Z. ....	91
Szutt A. ....	61
Szymkiewicz A. ....	7
Trusek-Hołownia A. ....	69
Wilk J. ....	7
Wiśniewska M. ....	25