

Biotechnologia, w tym biotechnologia drobnoustrojów, jest nowoczesnym i dynamicznie rozwijającym się obszarem wiedzy, integrującym osiągnięcia wielu dyscyplin naukowych z ich zastosowaniem w praktyce, w różnych obszarach działalności człowieka. Prezentowana publikacja odzwierciedla te relacje. Impulsem do przygotowania tej pozycji wydawniczej były przede wszystkim dwie książki opracowane uprzednio pod redakcją naukową Jerzego Długońskiego: *Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i pracownie specjalistyczne* (Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, 1997) oraz *Microbial Biodegradation: From Omics to Function and Application* (Caister Academic Press, 2016).

Oprócz zagadnień stanowiących podstawę biotechnologii drobnoustrojów, takich jak metody pozyskiwania i hodowli mikroorganizmów czy zastosowanie ich w przemyśle i ochronie środowiska, uwzględniono nowoczesne techniki analityczne określane ogólnym skrótem „omics”, a także techniki cyfrowe wykorzystywane do rejestrowania niekorzystnych zmian zachodzących w środowisku, w tym będących skutkiem szkodliwej działalności bakterii i grzybów. Dołączono też kolorowy atlas (rozdział 8) zawierający zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe grzybów omawianych w poszczególnych rozdziałach.

Podręcznik został przygotowany z wykorzystaniem wieloletniego doświadczenia naukowego i dydaktycznego autorów, prowadzących zajęcia na różnych kierunkach i specjalnościach nauk przyrodniczych. Zaowocowało to interdyscyplinarnym charakterem publikacji i pozwala sądzić, że będzie ona przydatna nie tylko doktorantom i studentom kierunków biotechnologia i mikrobiologia, lecz także ochrona środowiska, biotechnologie ekologiczne, ekomiasto, biomonitoring, rewitalizacja miast, jak również wszystkim zainteresowanym możliwością zastosowania najnowszych osiągnięć tych obszarów nauki w praktyce.

Książka dostępna również  
jako e-book



**WYDAWNICTWO  
UNIwersYTETU  
ŁÓDZKIEGO**

wydawnictwo.uni.lodz.pl  
ksiegarnia@uni.lodz.pl  
(42) 665 58 63

**Biotechnologia drobnoustrojów  
w laboratorium i w praktyce**

Teoria, ćwiczenia  
i pracownie specjalistyczne

# Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce

Teoria, ćwiczenia  
i pracownie  
specjalistyczne

pod redakcją Jerzego Długońskiego

**WYDAWNICTWO  
UNIwersYTETU  
ŁÓDZKIEGO**



# Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce





WYDAWNICTWO  
UNIWERSYTETU  
ŁÓDZKIEGO





# Biotechnologia drobnoustrojów w laboratorium i w praktyce

Teoria, ćwiczenia  
i pracownie  
specjalistyczne

pod redakcją Jerzego Długońskiego

Jerzy Długoński – Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii  
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16

RECENZENT  
*Grażyna Plaza*

REDAKTOR INICJUJĄCY  
*Beata Koźniewska*

REDAKTOR WYDAWNICTWA UŁ  
*Katarzyna Gorzkowska*

SKŁAD I ŁAMANIE  
*Munda – Maciej Torz*

PROJEKT OKŁADKI  
*krzysztof de mianiuk*

Opisy i źródła zdjęć wykorzystanych na okładce wymieniono na s. 578

© Copyright by Authors, Łódź 2020  
© Copyright for this edition by Uniwersytet Łódzki, Łódź 2020

Wydane przez Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego  
Wydanie I. W.09631.19.0.S

Ark. wyd. 24,0; ark. druk. 36,125

ISBN 978-83-8142-954-2  
e-ISBN 978-83-8142-955-9

Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego  
90-131 Łódź, ul. Lindleya 8  
www.wydawnictwo.uni.lodz.pl  
e-mail: księgarnia@uni.lodz.pl  
tel. 42 665 58 63

# Spis treści

Wprowadzenie (J. Długoński) / 11

Wstęp do wydania podręcznika *Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i pracownie specjalistyczne* z 1997 roku (J. Długoński) / 15

## 1. Metody pozyskiwania, hodowli, doskonalenia i przechowywania drobnoustrojów o znaczeniu przemysłowym / 17

1.1. Ogólna charakterystyka drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych (J. Długoński) / 19

1.2. Pozyskiwanie drobnoustrojów przydatnych w procesach mikrobiologicznych (J. Długoński, K. Lisowska, N. Wrońska, K. Zawadzka, A. Felczak) / 21

1.2.1. Przydatność różnych środowisk do izolacji drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach przemysłowych / 21

1.2.2. Gleba jako źródło potencjalnych producentów związków biologicznie aktywnych / 23

1.2.3. Skrining drobnoustrojów / 25

1.2.4. Gleba środowisk zanieczyszczonych jako źródło drobnoustrojów wykorzystywanych w procesach ochrony środowiska / 28

1.3. Metody hodowli oraz stabilizacji drobnoustrojów w warunkach tlenowych (z uwzględnieniem bioreaktorów i immobilizacji w żelach) (J. Długoński, P. Bernat, K. Lisowska, S. Walisch) / 35

1.3.1. Hodowla okresowa / 36

1.3.2. Hodowla półciągła – okresowa z ciągłym dozowaniem pożywki do fermentora (ang. *fed-batch culture*) / 39

1.3.3. Hodowle ciągłe (ang. *continous culture*) / 39

1.3.4. Bioreaktory do hodowli węgłbnych / 42

1.3.5. Stabilizacja drobnoustrojów na drodze immobilizacji / 44

1.4. Hodowla drobnoustrojów w warunkach beztlenowych (M. Krupiński) / 49

1.5. Protoplasty grzybów: otrzymywanie, właściwości, zastosowanie (J. Długoński, K. Paraszkiewicz, M. Słaba, K. Milczarek) / 56

1.6. Doskonalenie szczepów – mutageneza, fuzja i elektroporacja protoplastów (J. Długoński, D. Wilmańska, S. Różalska, K. Lisowska, K. Milczarek) / 61

1.7. Sposoby przechowywania szczepów przemysłowych (K. Zawadzka, N. Wrońska, S. Walisch, K. Milczarek, D. Wilmańska) / 77

Literatura / 84

## 2. Podstawy nowoczesnych technik wykorzystywanych w biotechnologii mikrobiologicznej i naukach pokrewnych / 89

- 2.1. Mikroskopia konfokalna, fluorescencyjna i spektrofлуorymetria (*S. Różalska*) / 91
  - 2.1.1. Zjawisko fluorescencji / 91
  - 2.1.2. Spektrofлуorymetria / 93
  - 2.1.3. Mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna – porównanie / 93
  - 2.1.4. Autofluorescencja i znaczniki fluorescencyjne / 95
  - 2.1.5. Białka fluorescencyjne / 95
- 2.2. Techniki izotopowe (izotopy promieniotwórcze) (*J. Długoński, S. Różalska*) / 100
- 2.3. Chromatografia (*R. Szewczyk*) / 103
  - 2.3.1. Podstawowe wielkości mierzone w chromatografii / 103
  - 2.3.2. Chromatografia cieczowa / 108
  - 2.3.3. Chromatografia gazowa / 114
- 2.4. Spektrometria mas (*R. Szewczyk*) / 116
  - 2.4.1. Zasada działania spektrometru masowego / 117
  - 2.4.2. Źródła jonów i rodzaje jonów w spektrometrii mas / 118
  - 2.4.3. Analizatory masowe / 121
  - 2.4.4. Podstawowe tryby skanowania / 124
  - 2.4.5. Detekcja jonów / 126
  - 2.4.6. Zastosowanie spektrometrii mas / 127
- 2.5. Absorpcyjna spektrometria atomowa (*M. Słaba*) / 127
- 2.6. Nowoczesne techniki cyfrowe stosowane do rejestrowania zmian zachodzących w środowisku (*A. Długoński*) / 132
  - 2.6.1. Obrazowanie terenu za pomocą systemu GIS / 132
  - 2.6.2. Zasady działania systemów detekcji (NDVI, UAV, ALS) / 136
- Literatura / 140

## 3. Określanie przynależności taksonomicznej drobnoustrojów / 143

- 3.1. Genotypowe techniki różnicowania i identyfikacji bakterii (*M. Krupiński*) / 145
  - 3.1.1. Izolacja z gleby i identyfikacja beztlenowców metodą multipleks PCR / 149
  - 3.1.2. Określenie przynależności gatunkowej promieniowców z rodzaju *Streptomyces* w oparciu o metodę PCR 16s rRNA / 155
- 3.2. Grzyby należące do Mucoromycota, Ascomycota i Basidiomycota – cechy morfologiczne, biochemiczne i analiza genetyczna (*M. Słaba, S. Różalska*) / 163
  - 3.2.1. Mucoromycota / 168
  - 3.2.2. Ascomycota (workowce) / 169
  - 3.2.3. Basidiomycota (podstawczaki) / 172
  - 3.2.4. Identyfikacja molekularna grzybów strzępkowych / 175
  - 3.2.5. Drożdże / 179
- 3.3. Biotypowanie drobnoustrojów metodami LC-MS/MS i MALDI-TOF/TOF (*R. Szewczyk*) / 183
  - 3.3.1. Biotypowanie LC-MS/MS na przykładzie szczepów *Mycobacterium* / 185
  - 3.3.2. Biotypowanie MALDI-TOF i MALDI-TOF/TOF / 191
- Literatura / 197

#### 4. Przemysłowe wykorzystanie drobnoustrojów / 201

- 4.1. Procesy biosyntezy (J. Długoński) / 203
  - 4.1.1. Otrzymywanie i wykorzystanie biomasy drobnoustrojów (P. Bernat) / 204
  - 4.1.2. Biosurfaktanty – mikrobiologiczne związki powierzchniowo czynne. Skrining bakterii z rodzaju *Bacillus*, zdolnych do produkcji biosurfaktantów o budowie cyklicznych lipopeptydów (K. Paraszewicz, A. Walaszczyk) / 208
  - 4.1.3. Mikrobiologiczna produkcja enzymów z grupy hydrolaz (J. Długoński, K. Paraszewicz, A. Jasińska, K. Milczarek) / 220
  - 4.1.4. Biosynteza wielocukrów (J. Długoński, S. Różalska) / 231
  - 4.1.5. Biosynteza antybiotyków na przykładzie tetracyklin (J. Długoński, P. Bernat) / 242
  - 4.1.6. Otrzymywanie lipopeptydów bakteryjnych z użyciem bioreaktora (P. Bernat) / 249
  - 4.1.7. Biosynteza kwasu cytrynowego (S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz) / 252
- 4.2. Procesy fermentacji (J. Długoński) / 257
  - 4.2.1. Winiarstwo i browarnictwo (S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz) / 258
  - 4.2.2. Praktyczne wykorzystanie bakterii fermentacji mlekowej (S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz) / 265
  - 4.2.3. Wykorzystanie drobnoustrojów w przemyśle piekarniczym oraz do produkcji fermentowanych produktów mięsnych i warzywnych (K. Paraszewicz, A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska) / 271
  - 4.2.4. Żywność azjatycka otrzymywana przy udziale drobnoustrojów (A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska, K. Paraszewicz) / 285
- 4.3. Procesy biotransformacji (J. Długoński) / 292
  - 4.3.1. Biotransformacja etanolu i sorbitolu (J. Długoński, S. Walisch) / 293
  - 4.3.2. Biotransformacja steroidów (J. Długoński) / 298
- Literatura / 304

#### 5. Drobnoustroje w ochronie środowiska i zdrowia człowieka / 313

- 5.1. Rewitalizacja zdegradowanych terenów zieleni miast (A. Długoński) / 315
  - 5.1.1. Interdyscyplinarność badań w rewitalizacji miejskiej: etapy pracy / 316
  - 5.1.2. Badania terenowe z zakresu architektury krajobrazu i dyscyplin pokrewnych / 318
  - 5.1.3. Badania laboratoryjne z zakresu biotechnologii, mikrobiologii, chemii środowiskowej i dyscyplin pokrewnych / 320
  - 5.1.4. Łączna ocena i podsumowanie badań / 322
- 5.2. Analiza mikrobiologiczna skażonych środowisk – sekwencjonowanie nowej generacji (S. Różalska) / 329
- 5.3. Biologiczne oczyszczanie ścieków / 336
  - 5.3.1. Biologiczne metody oczyszczania ścieków w oczyszczalniach komunalnych (K. Lisowska, K. Zawadzka) / 338
  - 5.3.2. Oczyszczanie ścieków komunalno-przemysłowych (A. Długoński) / 340
  - 5.3.3. Oczyszczalnie ścieków w terenie o zabudowie rozproszonej – mała infrastruktura (A. Długoński) / 342
- 5.4. Kompostowanie odpadów (A. Długoński, K. Lisowska) / 345
  - 5.4.1. Kompostowanie odpadów w kompostowniach zakładów komunalnych / 345
  - 5.4.2. Lokalne wykorzystanie odpadów z terenów zieleni miejskiej / 347



5.5. Wykorzystanie odpadów zieleni miejskiej do produkcji energii w lokalnych biogazowniach i spalarniach oraz syntezy lakaz grzybowych (A. Długoński, A. Góralczyk-Bińkowska)	/ 350
5.5.1. Produkcja energii	/ 350
5.5.2. Wykorzystanie odpadów zieleni miejskiej do biosyntezy enzymów grzybowych na przykładzie lakaz	/ 352
5.6. Biodegradacja toksycznych ksenobiotyków (J. Długoński)	/ 355
5.6.1. Bisfenol A (A. Jasińska)	/ 357
5.6.2. Organiczne związki cyny (P. Bernat, A. Felczak, J. Długoński)	/ 362
5.6.3. Zastosowanie drobnoustrojów do eliminacji pestycydów (P. Bernat)	/ 366
5.6.4. Nonylofenol (J. Długoński, S. Różalska)	/ 370
5.6.5. Jednoczesna eliminacja zanieczyszczeń pochodzenia organicznego i nieorganicznego na przykładzie alachloru i cynku (M. Staba, J. Długoński)	/ 371
5.6.6. Związki heterocykliczne (A. Felczak, N. Wrońska)	/ 375
5.6.7. Barwniki (A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska)	/ 379
5.7. Mikrobiologiczna eliminacja metali ciężkich ze środowiska (M. Staba, J. Nykiel-Szymańska)	/ 384
5.8. Procesy detoksykacji skażonych środowisk. Testy toksykologiczne (M. Krupiński)	/ 395
5.9. Wykorzystanie odpadów przemysłowych w biotechnologii mikrobiologicznej (K. Paraszkie-wicz, A. Góralczyk-Bińkowska, A. Jasińska)	/ 401
5.10. Biodeterioracja wywołana przez grzyby (S. Różalska, M. Staba, A. Długoński)	/ 409
5.11. Charakterystyka i wykorzystanie enzymów ligninolitycznych produkowanych przez grzyby w ochronie środowiska, przemyśle i medycynie (A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska, A. Długoński)	/ 417
5.12. Określanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych makromolekuł (dendrymery) i nowo syntetyzowanych związków srebra (A. Felczak, K. Zawadzka)	/ 424
5.13. Grzyby entomopatogenne i ich wykorzystanie w biokontroli (S. Różalska)	/ 429
5.14. Grzyby toksynotwórcze. Poszukiwanie i identyfikacja aflatoksyn (K. Paraszkie-wicz, M. Staba, R. Szewczyk)	/ 434
Literatura	/ 445

## 6. Omics w biotechnologii drobnoustrojów / 457

6.1. Proteomika w analizie mikrobiologicznej degradacji ksenobiotyków (R. Szewczyk)	/ 459
6.1.1. Izolacja i separacja białek	/ 460
6.1.2. Identyfikacja białek	/ 464
6.2. Analiza metabolomiczna jako narzędzie służące do wielopoziomowej charakterystyki proce-su biodegradacji (R. Szewczyk)	/ 472
6.3. Zastosowanie lipidomiki w badaniu procesów detoksykacji u drobnoustrojów (P. Bernat)	/ 478
6.4. Poszukiwanie biomarkerów w przemyśle i medycynie (R. Szewczyk)	/ 485
6.4.1. Metody analityczne	/ 486
6.4.2. Charakterystyka i źródła biomarkerów	/ 487
6.5. Analiza ilościowa pestycydów – multimetody (R. Szewczyk)	/ 490
6.5.1. Multimetody	/ 490
6.5.2. Walidacja metody	/ 492
Literatura	/ 497

**7. Podłoża, bufory (K. Milczarek, N. Wrońska, A. Felczak) / 499**

7.1. Podłoża / 501

7.2. Bufory / 519

Literatura / 521

**8. Zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe szczepów grzybów stosowanych w badaniach i w dydaktyce Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii Uniwersytetu Łódzkiego / 523****8.1. Zdjęcia grzybów z hodowli prowadzonych w warunkach laboratoryjnych (K. Milczarek, S. Różalska) / 525**8.1.1. *Aerobasidium pullulans* / 5258.1.2. *Ashbya gossypii* / 5268.1.3. *Aspergillus niger* / 5278.1.4. *Aspergillus versicolor* IM2161 / 5288.1.5. *Chaetomium globosum* / 5298.1.6. *Cunninghamella echinulata* IM1785 21Gp (poprzednia nazwa *C. elegans*) / 5308.1.7. *Curvularia lunata* IM2901 / 5338.1.8. *Curvularia lunata* IM4417 / 5368.1.9. *Exophiala* sp. / 5378.1.10. *Kluyveromyces marxianus* / 5388.1.11. *Metarhizium robertsii* IM2358 / 5398.1.12. *Mucor ramosissimus* IM6203 / 5408.1.13. *Myrothecium roridum* IM6482 / 5428.1.14. *Nectriella pironii* IM6443 / 5438.1.15. *Paecilomyces marquandii* IM6003 (obecna nazwa *Metarhizium marquandii*) / 5448.1.16. *Phanerochaete chrysosporium* DSM1556 / 5468.1.17. *Schizosaccharomyces pombe* / 5478.1.18. *Serpula himantoides* DSM6419 / 5498.1.19. *Stachybotrys chartarum* DSM2144 / 5508.1.20. *Trametes versicolor* / 5518.1.21. *Trichoderma harzianum* QF10 / 5538.1.22. *Trichoderma viride* IM6325 / 5548.1.23. *Umbelopsis ramanniana* IM833 / 555**8.2. Fotografie drzew i drewna porażonych przez grzyby ligninolityczne (A. Długoński) / 556**8.2.1. *Pleurotus ostreatus* (bocznik ostrygowaty) / 5568.2.2. *Trametes versicolor* (wrośniak różnobarwny) / 5578.2.3. *Heterobasidion annosum* (korzeniowiec sosnowy) / 557

8.2.4. Brunatna zgnilizna drewna / 558

8.2.5. Biała zgnilizna drewna / 560

8.2.6. Szara zgnilizna drewna / 561

8.2.7. *Tremella mesenterica* (trzęsak pomarańczowożółty) / 5628.2.8. *Phellinus pomaceus* (czyreń śliwowy) / 5648.2.9. *Piptorus betulinus* (białoporek brzozy, biała huba brzozy) / 5658.2.10. *Fomes fomentarius* (hubiak pospolity) / 566

8.2.11. Współdziałanie patogenów powodujących zgniliznę drzew / 567

8.2.12. *Schizophyllum commune* (rozszczepka pospolita) / 568

Literatura / 569

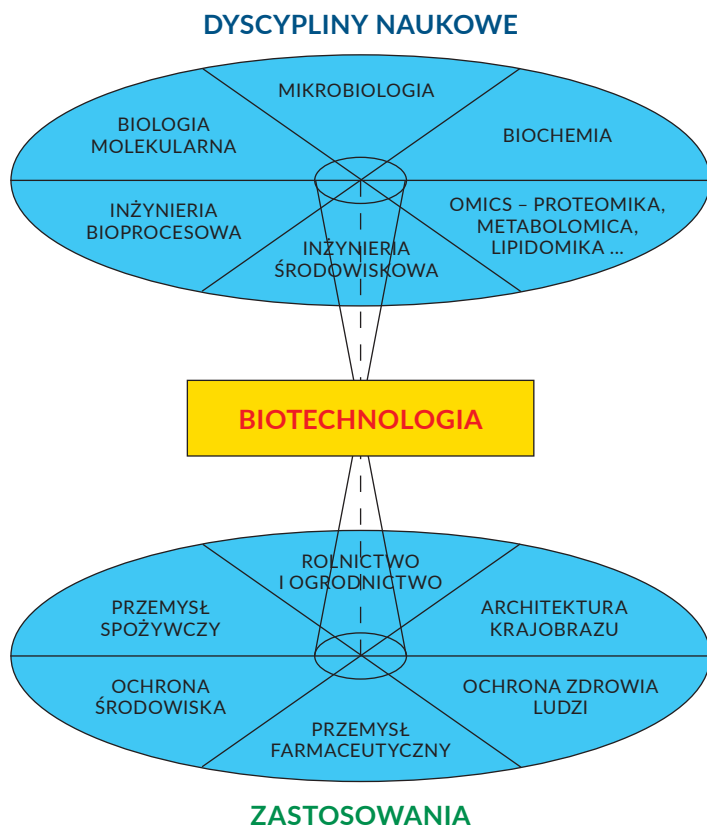
Autorzy / 571

## Wprowadzenie

Nauki biologiczne, w tym biotechnologia, mikrobiologia i dyscypliny pokrewne, należą do jednych z najszybciej rozwijających się obszarów nauki w drugiej połowie XX wieku i w czasach obecnych. Przyczyniło się do tego zarówno odkrycie struktury DNA w 1953 roku przez Watsona i Cricka, jak i rozwój nowoczesnych technik i metod badawczych, pozwalających na analizowanie i opisywanie procesów zachodzących w organizmach z dużą dokładnością w krótkim okresie czasu. Odzwierciedleniem tego jest stale wzrastająca w obiegu międzynarodowym liczba publikacji naukowych, a także pojawianie się na uczelniach nowych kierunków nauczania, często o charakterze interdyscyplinarnym, umożliwiających studentom zdobycie wiedzy z różnych obszarów nauki i ułatwiających odnalezienie się na ciągle zmieniającym się rynku pracy. Taką rolę spełnia m.in. biotechnologia, łącząca najnowsze osiągnięcia intensywnie rozwijających się nauk przyrodniczych z ich wykorzystaniem w różnych dziedzinach działalności człowieka, co zobrazowano na rycinie poniżej, uwzględniając zarówno w górnym, jak i dolnym polu przede wszystkim obszary wiedzy i praktyki omawiane w tym podręczniku.

W pierwszych dwóch rozdziałach omówiono zasady pozyskiwania szczepów drobnoustrojów wykorzystywanych w praktyce, metody ich hodowli, ulepszania pod względem właściwości przydatnych z aplikacyjnego punktu widzenia oraz najistotniejsze kwestie związane z przechowywaniem w warunkach sprzyjających przeżyciu drobnoustrojów i utrzymaniu ich pożądanых cech. W tej części podręcznika pominięto podstawowe techniki mikrobiologiczne, zakładając, że są one znane z kursów ogólnych mikrobiologii. Natomiast skoncentrowano się na zaznajomieniu Czytelnika z najnowszymi technikami analitycznymi stosowanymi w mikrobiologii, biotechnologii i naukach pokrewnych – z mikroskopią konfokalną, fluorescencyjną, spektrofotometrią, technikami

izotopowymi, chromatograficznymi, absorpcyjną spektrometrią atomową. Przedstawiono tutaj również zasady teledetekcji lotniczej i satelitarnej, umożliwiające szybkie wykrycie i obiektywną ocenę zagrożeń spowodowanych przez patogeny bakteryjne, wirusowe i grzybowe na terenach upraw rolniczych, leśnych, a także w obrębie obszarów zieleni miejskiej (ryc. 2.6.1.4).



**Ryc. 1.** Powiązania między wybranymi naukami przyrodniczymi i obszarami działalności człowieka

Rozdział trzeci poświęcony został identyfikacji uprzednio wyizolowanych bakterii i grzybów z uwzględnieniem wykorzystania najnowszych technik, w tym przedstawionych już w poprzednim rozdziale metod MALDI-TOF/TOF i LC-MS/MS.

W rozdziale czwartym przedstawiono możliwości wykorzystania drobnoustrojów w skali przemysłowej. Ta część publikacji została w dużej mierze oparta na poprzednio wydanym

podręczniku *Biotechnologia mikrobiologiczna. Ćwiczenia i prace specjalistyczne* pod redakcją Jerzego Długońskiego, który ukazał się w 1997 roku w Wydawnictwie Uniwersytetu Łódzkiego. Ze względu na to, że układ tamtego podręcznika zyskał aprobatę zarówno dydaktyków, jak i studentów, utrzymano podział omawianych zagadnień na procesy biosyntezy, fermentacji i biotransformacji, uaktualniając jednocześnie zawarte tam treści oraz wprowadzając dodatkowe podrozdziały dotyczące produkcji biosurfaktantów i żywności wytwarzanej z udziałem mikroorganizmów.

Przesłanką przy opracowywaniu rozdziału piątego, najobszerniejszego i jednocześnie odzwierciedlającego interdyscyplinarne podejście autorów poszczególnych podrozdziałów do rozwiązywania problemów związanych z ochroną zdrowia i środowiska człowieka, były zarówno wcześniejsze publikacje, w tym obszerna monografia *Microbial Biodegradation. From Omics to Function and Application* (edited by Jerzy Długoński, Caister Academic Press, Norfolk 2016), jak i współpraca z naukowcami z innych dziedzin nauki, w kraju i za granicą.

Rozdział szósty stanowi zbiór przykładów uwidaczniających korzyści wynikające z wykorzystania najnowszych technik analitycznych w badaniach naukowych oraz w szeroko rozumianej ochronie zdrowia i środowiska.

Końcowa część podręcznika (rozdział siódmy i ósmy) to wykaz podłoży i buforów wraz z ich składem, stosowanych w części praktycznej poszczególnych podrozdziałów, a także zdjęcia makroskopowe i mikroskopowe szczepów grzybów wykorzystywanych przez autorów podręcznika w badaniach i dydaktyce.

Podręcznik został przygotowany na podstawie wieloletniego doświadczenia dydaktycznego i naukowego autorów, prowadzących zajęcia na różnych kierunkach i specjalnościach, co zaowocowało wielostronnym charakterem opracowania. Z tego względu autorzy podręcznika wyrażają przekonanie, że będzie on przydatny zarówno dla studentów biotechnologii, mikrobiologii, ekologii, jak i kierunków o charakterze interdyscyplinarnym, takich jak ekomiasto, ochrona środowiska, biomonitoring i biotechnologie ekologiczne czy rewitalizacja miast.

Autorzy podręcznika pragną wyrazić serdeczne podziękowania Recenzentce, prof. dr hab. Grażynie Płazie, której cenne



uwagi i komentarze przyczyniły się owocnie do przygotowania jego końcowej wersji. Szczególne podziękowania kierowane są także do mgr Aleksandry Góralczyk-Bińkowskiej, dr Anny Jasińskiej, mgr Małgorzaty Krokockiej i dr Katarzyny Zawadzkiej za zatroszczenie się o staranną szatę edytorską i graficzną podręcznika.

Mając na względzie ewentualne kolejne wydanie podręcznika, autorzy będą wdzięczni za nadsyłanie uwag krytycznych do redaktora naukowego ([jerzy.dlugonski@biol.uni.lodz.pl](mailto:jerzy.dlugonski@biol.uni.lodz.pl)).

*Jerzy Długoński*

Łódź, 12 grudnia 2019 r.

# Microbial biotechnology in the laboratory and in practice





WYDAWNICTWO  
UNIWERSYTETU  
ŁÓDZKIEGO



# Microbial biotechnology in the laboratory and in practice

Theory, exercises  
and specialist  
laboratories

edited by Jerzy Długoński

Jerzy Długoński – University of Łódź, Faculty of Biology and Environmental  
Protection, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology  
Department of Industrial Microbiology and Biotechnology, 90-237 Łódź, 12/16  
Banacha St.

REVIEWER  
*Grażyna Plaza*

INITIATING EDITOR  
*Beata Koźniewska*

EDITOR OF THE PUBLISHING HOUSE  
*Katarzyna Gorzkowska*

TYPESETTING  
*Munda – Maciej Torz*

COVER DESIGN  
*krzysztof de mianiuk*

Descriptions and sources of the photos used on the cover are listed on page  
578.

© Copyright by Authors, Łódź 2020  
© Copyright for this edition by University of Łódź, Łódź 2020

Published by University of Łódź Publishing House  
First edition. W.09631.19.0.S

Publisher's sheets 24.0; Printing sheets 36.125

ISBN 978-83-8142-954-2  
e-ISBN 978-83-8142-955-9

University of Łódź Publishing House  
90-131 Łódź, 8 Lindleya St.  
[www.wydawnictwo.uni.lodz.pl](http://www.wydawnictwo.uni.lodz.pl)  
e-mail: [ksiegarnia@uni.lodz.pl](mailto:ksiegarnia@uni.lodz.pl)  
tel. 42 665 58 63



# Table of contents

Preface (*J. Długoński*) / 11

Preface to the handbook *Microbiological Biotechnology. Exercises and specialist laboratories* from 1997 (*J. Długoński*) / 15

## 1. Methods of obtaining, culturing, improvement and storing microorganisms of industrial importance / 17

- 1.1. General characteristics of microorganisms used in biotechnological processes (*J. Długoński*) / 19
- 1.2. Acquisition of microorganisms useful in microbiological processes (*J. Długoński, K. Lisowska, N. Wrońska, K. Zawadzka, A. Felczak*) / 21
  121. Suitability of various environments for isolation of microorganisms used in industrial processes / 21
  122. Soil as a source of potential producers of biologically active compounds / 23
  123. Microbial screening / 25
  124. Soil of polluted environments as a source of microorganisms used in environmental protection processes / 28
- 1.3. Methods of culturing and stabilization of microorganisms under aerobic conditions (including bioreactors and immobilization in gels) (*J. Długoński, P. Bernat, K. Lisowska, S. Walisch*) / 35
  131. Batch culture / 36
  132. Fed batch culture – batch with continuous dosing of nutrient to the fermenter / 39
  133. Continuous culture / 39
  134. Bioreactors for deep cultures / 42
  135. Stabilization of microorganisms by immobilization / 44
- 1.4. Microorganisms culture in anaerobic conditions (*M. Krupiński*) / 49
- 1.5. Fungi protoplasts: obtaining, properties, application (*J. Długoński, K. Paraszkiewicz, M. Ślaba, K. Milczarek*) / 56
- 1.6. Strain improvement - mutagenesis, fusion and electroporation of protoplasts (*J. Długoński, D. Wilmańska, S. Różalska, K. Lisowska, K. Milczarek*) / 61
- 1.7. Ways of industrial strains storing (*K. Zawadzka, N. Wrońska, S. Walisch, K. Milczarek, D. Wilmańska*) / 77
- Literature / 84

## 2. Basics of modern analytical techniques used in microbiological biotechnology and related sciences / 89

- 21. Confocal, fluorescent microscopy and spectrofluorimetry (*S. Różalska*) / 91
  - 21.1. Fluorescence phenomenon / 91
  - 21.2. Spectrofluorimetry / 93
  - 21.3. Fluorescent and confocal microscopy – comparison / 93
  - 21.4. Autofluorescence and fluorescent markers / 95
  - 21.5. Fluorescent proteins / 95
- 22. Isotopic techniques (radioactive isotopes) (*J. Długoński, S. Różalska*) / 100
- 23. Chromatography (*R. Szewczyk*) / 103
  - 23.1. Basic values measured in chromatography / 103
  - 23.2. Liquid chromatography / 108
  - 23.3. Gas chromatography / 114
- 24. Mass spectrometry (*R. Szewczyk*) / 116
  - 24.1. Principle of mass spectrometer operation / 117
  - 24.2. Ion sources and ion types in mass spectrometry / 118
  - 24.3. Mass analyzers / 121
  - 24.4. Basic scanning modes / 124
  - 24.5. Ion detection / 126
  - 24.6. Application of mass spectrometry / 127
- 25. Atomic absorption spectrometry (*M. Słaba*) / 127
- 26. Modern digital techniques used to record changes in the environment (*A. Długoński*) / 132
  - 26.1. Area imaging by means of GIS system / 132
  - 26.2. Principles of detection systems (NDVI, UAV, ALS) / 136

Literature / 140

## 3. Determining the taxonomic affiliation of the microorganisms / 143

- 31. Genotypic techniques for differentiation and identification of bacteria (*M. Krupiński*) / 145
  - 31.1. Isolation from the soil and identification of anaerobes by multiplex PCR / 149
  - 31.2. Determination of species affiliation of *Streptomyces* actinomycete based on PCR 16S rRNA method / 155
- 32. Fungi belonging to Mucoromycota, Ascomycota and Basidiomycota - morphological, biochemical features and genetic analysis (*M. Słaba, S. Różalska*) / 163
  - 32.1. Mucoromycota / 168
  - 32.2. Ascomycota / 169
  - 32.3. Basidiomycota / 172
  - 32.4. Molecular identification of filamentous fungi / 175
  - 32.5. Yeasts / 179
- 33. Microbial biotyping by LC-MS/MS and MALDI-TOF/TOF methods (*R. Szewczyk*) / 183
  - 33.1. LC-MS/MS biotyping on the example of *Mycobacterium* strains / 185
  - 33.2. MALDI-TOF and MALDI-TOF/TOF biotyping / 91

Literature / 197

#### 4. Industrial application of microorganisms / 201

41. Biosynthesis processes (*J. Długoński*) / 203
    - 41.1. Microbial biomass obtaining and using (*P. Bernat*) / 204
    - 41.2. Biosurfactants - microbiological surfactants. Screening of bacteria of the genus *Bacillus*, capable of producing biosurfactants with the structure of cyclic lipopeptides (*K. Paraszewicz, A. Walaszczyk*) / 208
    - 41.3. Microbiological production of enzymes from the hydrolases group (*J. Długoński, K. Paraszewicz, A. Jasińska, K. Milczarek*) / 220
    - 41.4. Polysaccharides biosynthesis (*J. Długoński, S. Różalska*) / 231
    - 41.5. Biosynthesis of antibiotics on the example of tetracyclines (*J. Długoński, P. Bernat*) / 242
    - 41.6. Bacterial lipopeptides obtaining using bioreactor (*P. Bernat*) / 249
    - 41.7. Citric acid biosynthesis (*S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz*) / 252
  42. Fermentation processes (*J. Długoński*) / 257
    - 42.1. Winemaking and brewing (*S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz*) / 258
    - 42.2. Practical use of lactic acid bacteria (*S. Walisch, P. Bernat, K. Paraszewicz*) / 265
    - 42.3. Use of microorganisms in the baking industry and for the production of fermented meat and vegetable products (*K. Paraszewicz, A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska*) / 271
    - 42.4. Asian food obtained by the use of microorganisms (*A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska, K. Paraszewicz*) / 285
  43. Biotransformation processes (*J. Długoński*) / 292
    - 43.1. Biotransformation of ethanol and sorbitol (*J. Długoński, S. Walisch*) / 293
    - 43.2. Biotransformation of steroids (*J. Długoński*) / 298
- Literature / 304

#### 5. Microorganisms in environmental and human health protection / 313

51. Revitalization of degraded urban green areas (*A. Długoński*) / 315
  - 51.1. Interdisciplinary research in urban revitalization: work stages / 316
  - 51.2. Field research in the scope of landscape architecture and related disciplines / 318
  - 51.3. Laboratory research in biotechnology, microbiology, environmental chemistry and related disciplines / 320
  - 51.4. Total score and summary of research / 322
52. Microbiological analysis of contaminated environments – Next-generation sequencing (*S. Różalska*) / 329
53. Biological sewage treatment / 336
  - 53.1. Biological methods of sewage treatment in municipal treatment plants (*K. Lisowska, K. Zawadzka*) / 338
  - 53.2. Municipal-industrial sewage treatment (*A. Długoński*) / 340
  - 53.3. Sewage treatment in scattered areas - small infrastructure (*A. Długoński*) / 342
54. Waste composting (*A. Długoński, K. Lisowska*) / 345
  - 54.1. Waste composting in municipal composting plants / 345
  - 54.2. Local use of waste from urban green areas / 347

- 5.5. Use of municipal green waste for energy production in local biogas and incineration plants and the synthesis of fungal laccases (*A. Długoński, A. Góralczyk-Bińkowska*) / 350
  - 5.5.1. Energy production / 350
  - 5.5.2. Use of urban green waste for biosynthesis of fungal enzymes on the example of laccases / 352
- 5.6. Biodegradation of toxic xenobiotics (*J. Długoński*) / 355
  - 5.6.1. Bisphenol A (*A. Jasińska*) / 357
  - 5.6.2. Organic tin compounds (*P. Bernat, A. Felczak, J. Długoński*) / 362
  - 5.6.3. Use of microorganisms to eliminate pesticides (*P. Bernat*) / 366
  - 5.6.4. Nonylphenol (*J. Długoński, S. Różalska*) / 370
  - 5.6.5. Simultaneous elimination of organic and inorganic pollutants based on the example of alachlor and zinc (*M. Słaba, J. Długoński*) / 371
  - 5.6.6. Heterocyclic compounds (*A. Felczak, N. Wrońska*) / 375
  - 5.6.7. Dyes (*A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska*) / 379
- 5.7. Microbiological elimination of heavy metals from the environment (*M. Słaba, J. Nykiel-Szymańska*) / 384
- 5.8. Detoxification processes of contaminated environments. Toxicological tests (*M. Krupiński*) / 395
- 5.9. Use of industrial waste in microbiological biotechnology (*K. Paraszewicz, A. Góralczyk-Bińkowska, A. Jasińska*) / 401
- 5.10. Biodeterioration caused by fungi (*S. Różalska, M. Słaba, A. Długoński*) / 409
- 5.11. Characteristics and use of ligninolytic enzymes produced by fungi in environmental protection, industry and medicine (*A. Jasińska, A. Góralczyk-Bińkowska, A. Długoński*) / 417
- 5.12. Determination of antimicrobial properties of macromolecules (dendrimers) and newly synthesized silver compounds (*A. Felczak, K. Zawadzka*) / 424
- 5.13. Entomopathogenic fungi and their use in biocontrol (*S. Różalska*) / 429
- 5.14. Toxigenic fungi. Search for and identification of aflatoxins (*K. Paraszewicz, M. Słaba, R. Szewczyk*) / 434
- Literature / 445

## 6. Omics in microbial biotechnology / 457

- 6.1. Proteomics in microbiological analysis of xenobiotics degradation (*R. Szewczyk*) / 459
  - 6.1.1. Isolation and separation of proteins / 460
  - 6.1.2. Identification of proteins / 464
- 6.2. Metabolomic analysis as a tool for multi-level characterization of the biodegradation process (*R. Szewczyk*) / 472
- 6.3. Application of lipidomics in the study of detoxification processes in microorganisms (*P. Bernat*) / 478
- 6.4. Search for biomarkers in industry and medicine (*R. Szewczyk*) / 485
  - 6.4.1. Analytical methods / 486
  - 6.4.2. Characteristics and sources of biomarkers / 487
- 6.5. Quantitative analysis of pesticides - multimethods (*R. Szewczyk*) / 490
  - 6.5.1. Multimethods / 490
  - 6.5.2. Validation of the method / 492
- Literature / 497

**7. Media, buffers (K. Milczarek, N. Wrońska, A. Felczak) / 499**

7.1. Media / 501

7.2. Buffers / 519

Literature / 521

**8. Macroscopic and microscopic photos of fungal strains used in research and didactics of the Department of Industrial Microbiology and Biotechnology at the University of Łódź / 523**

8.1. Photos of fungi from cultures conducted in laboratory conditions (K. Milczarek, S. Różalska) / 525

8.1.1. *Aerobasidium pullulans* / 5258.1.2. *Ashbya gossypii* / 5268.1.3. *Aspergillus niger* / 5278.1.4. *Aspergillus versicolor* IM2161 / 5288.1.5. *Chaetomium globosum* / 5298.1.6. *Cunninghamella echinulata* IM1785 21Gp (previously *C. elegans*) / 5308.1.7. *Curvularia lunata* IM2901 / 5338.1.8. *Curvularia lunata* IM4417 / 5368.1.9. *Exophiala* sp. / 5378.1.10. *Kluyveromyces marxianus* / 5388.1.11. *Metarhizium robertsii* IM2358 / 5398.1.12. *Mucor ramosissimus* IM6203 / 5408.1.13. *Myrothecium roridum* IM6482 / 5428.1.14. *Nectriella pironii* IM6443 / 5438.1.15. *Paecilomyces marquandii* IM6003 (currently *Metarhizium marquandii*) / 5448.1.16. *Phanerochaete chrysosporium* DSM1556 / 5468.1.17. *Schizosacharomyces pombe* / 5478.1.18. *Serpula himantioides* DSM6419 / 5498.1.19. *Stachybotrys chartarum* DSM2144 / 5508.1.20. *Trametes versicolor* / 5518.1.21. *Trichoderma harzianum* QF10 / 5538.1.22. *Trichoderma viride* IM6325 / 5548.1.23. *Umbelopsis ramanniana* IM833 / 555

8.2. Photographs of trees and wood infected by ligninolytic fungi (A. Długoński) / 556

8.2.1. *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) / 5568.2.2. *Trametes versicolor* (turkey tail) / 5578.2.3. *Heterobasidion annosum* (annosum root rot) / 557

8.2.4. Brown wood rot / 558

8.2.5. White wood rot / 560

8.2.6. Soft wood rot / 561

8.2.7. *Tremella mesenterica* (yellow brain) / 5628.2.8. *Phellinus pomaceus* / 5648.2.9. *Piptorus betulinus* (birch polypore) / 5658.2.10. *Fomes fomentarius* (tinder fungus) / 566

8.2.11. Interaction of pathogens causing the rot of trees / 567

8.2.12. *Schizophyllum commune* (split gill) / 568

Literature / 569

Authors / 571

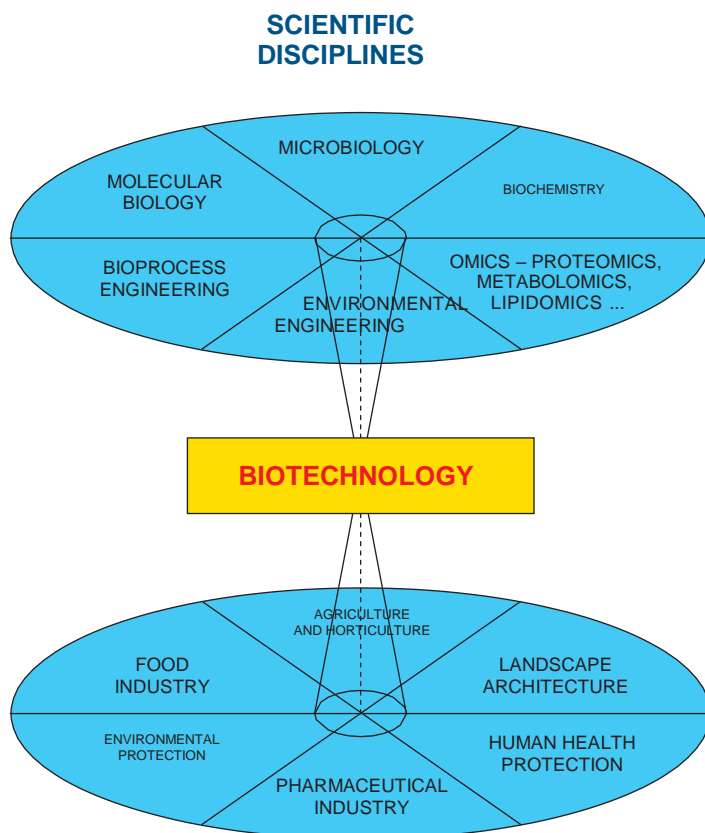


## Preface

Life sciences, including biotechnology, microbiology, and related disciplines, are among the fastest growing areas of science in the second half of the 20th century and today. The discovery of the DNA structure in 1953 by Watson and Crick, as well as the development of modern research techniques and methods that allow to analyze and describe the processes taking place in organisms with great accuracy in a short period of time, have contributed to this. This is reflected in the ever-increasing number of scientific publications in the international literature, as well as the emergence of new fields of study at universities, often of an interdisciplinary nature, enabling students to acquire knowledge from different areas of science and facilitating their finding their way in the ever-changing job market. Such a role is fulfilled, among others, by biotechnology, which combines the latest achievements of the intensely developing natural sciences with their use in various areas of human activity, as shown in the figure below, considering, both in the upper and lower fields, primarily the areas of knowledge and practice discussed in this handbook.

The first two chapters discuss the principles of obtaining strains of microorganisms used in practice, the methods of their cultivation, improvement in terms of properties useful from the application point of view, and the most important issues related to storage in conditions conducive to the survival of the microorganisms and maintenance of their desired properties. This part of the handbook omits basic microbiological techniques, assuming that they are known from general microbiology courses. The focus is on familiarizing the reader with the latest analytical techniques used in microbiology, biotechnology, and related sciences – confocal and fluorescence microscopy, spectrofluorimetry, isotope techniques, chromatography, atomic absorption

spectrometry. The principles of aerial and satellite remote sensing are also presented here, enabling rapid detection and objective assessment of threats caused by bacterial, viral, and fungal pathogens in agricultural, forest, and urban green areas (Figure 2.6.1.4).



**Fig. 1.** Relationships between selected natural sciences and areas of human activity

The third chapter is devoted to the identification of previously isolated bacteria and fungi, considering the use of the latest techniques, including MALDI-TOF/TOF and LC-MS/MS methods already presented in the previous chapter.

The fourth chapter presents the possibilities of using microorganisms on an industrial scale. This part of the publication is largely based on the previously published handbook *Microbiological Biotechnology. Exercises and specialist laboratories* edited by Jerzy Długoński, which was published in 1997 in the University of Lodz Publishing House. Due to the fact that the layout of that handbook gained the approval of both teachers and students, the division of the discussed issues into biosynthesis, fermentation, and biotransformation processes was maintained, at the same time updating its contents and introducing additional subsections concerning the production of biosurfactants and food produced with the participation of microorganisms.

The rationale for the development of chapter five, the most extensive and at the same time reflecting the interdisciplinary approach of the authors of individual subchapters to solving problems related to the protection of human health and the environment, were both earlier publications, including an extensive monograph *Microbial Biodegradation. From Omics to Function and Application* (edited by Jerzy Długoński, Caister Academic Press, Norfolk 2016) as well as cooperation with scientists from other fields of science in Poland and abroad.

Chapter six is a collection of examples demonstrating the benefits of using the latest analytical techniques in scientific research and in the protection of health and the environment in a broad sense.

The final part of the handbook (chapters seven and eight) is a list of media and buffers with their composition, used in the practical part of individual subchapters, as well as macroscopic and microscopic images of fungal strains used by the authors of the handbook in research and didactics.

The handbook was prepared on the basis of many years of didactic and scientific experience of the authors, conducting classes in various fields and specialties, which resulted in a multilateral character of the handbook. For this reason, the authors of the handbook are convinced that it will be useful for students of biotechnology, microbiology, and ecology, as well as interdisciplinary faculties such as eco-town, environmental protection, biomonitoring and ecological biotechnology or urban revitalization.

The authors of the handbook would like to express their heartfelt thanks to the Reviewer, Prof. Grażyna Płaza, whose

valuable comments and remarks contributed fruitfully to the preparation of its final version. Special thanks are also addressed to Aleksandra Góralczyk-Bińkowska, MSc, Anna Jasińska, PhD, Małgorzata Krokocka, MSc and Katarzyna Zawadzka, PhD, for taking care of the careful editorial and graphic design of the handbook.

With a view to a possible next edition of the handbook, the authors will be grateful for sending critical comments to the scientific editor ([jerzy.dlugonski@biol.uni.lodz.pl](mailto:jerzy.dlugonski@biol.uni.lodz.pl)).

*Jerzy Długoński*

Łódź, 12 December 2019