

IZOLACJA I KINETYCZNA CHARAKTERYSTYKA MIKROORGANIZMÓW DEGRADUJĄCYCH METYLOIZOBUTYLOKETON (MIBK)

¹Krystyna PRZYBULEWSKA, ²Andrzej WIECZOREK,

¹Akademia Rolnicza w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin

²Politechnika Szczecińska, Al. Piastów 42, 71-065 Szczecin, anwiecz@ps.pl

STRESZCZENIE

Ze złoża biofiltra wykorzystywanego do oczyszczania powietrza, domieszkowanego MIBK, wyizolowano dziewięć szczepów bakterii rozkładających tę substancję, wykorzystywaną jako jedyne źródło węgla i energii. Najaktywniejsze z nich zostały zidentyfikowane jako *Rhodococcus globerulus*, *Gordonia terrae*, *Gordonia bronchialis*, *Bacillus subtilis*. Szybkość rozkładania MIBK przez te mikroorganizmy testowano w zakresie jego stężeń w powietrzu od około 0,1 do 3 g/m³. Degradowały one MIBK z szybkością, której wartości maksymalne mieściły się w zakresie od około 15 do około 50 g/(m³·h). Największą szybkość biodegradacji w suspensji (EC) – 163 g/(m³·h) zaobserwowano w przypadku *Gordonia terrae*.

1. Wstęp

Problem usuwania zanieczyszczeń emitowanych do atmosfery z przemysłowymi gazami odlotowymi nabiera dziś szczególnego znaczenia. Główne antropogeniczne źródła emisji tych związków to m.in., transport oraz przemysły farb i lakierów, chemiczny, petrochemiczny, koksowniczy, farmaceutyczny, barwników i tym podobne. Szkodliwość tych związków wynika nie tylko z ich pierwotnej toksyczności, ale i z faktu, że wiele z nich ulega w powietrzu złożonym przemianom, prowadzącym często do istotnego wzrostu toksyczności emisji. Szkodliwe emisje można ograniczać na wiele sposobów. Jednymi z lepszych ze środowiskowego i ekonomicznego punktu widzenia są metody oparte na naturalnych zdolnościach mikroorganizmów do biodegradacji substancji organicznych.

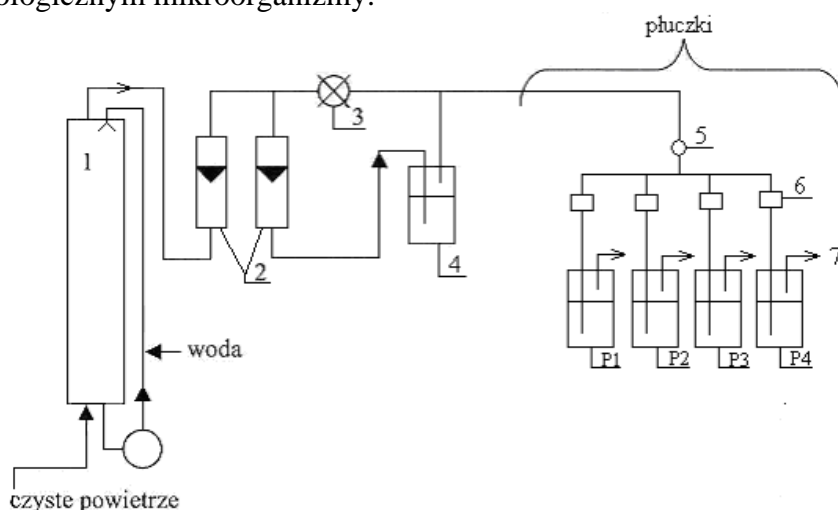
Celem pracy było poszukiwanie nowych szczepów bakterii zdolnych do rozkładu metyloizobutyloketonu (MIBK) oraz charakterystyka ich aktywności.

2. Metodyka badawcza

2.1. Izolacja mikroorganizmów

Mikroorganizmy stosowane w badaniach wyizolowano z przepracowanego złoża biofiltra wielkolaboratoryjnego, usuwającego MIBK, skomponowanego na bazie kompostu z odpadów miejsko-przemysłowych z kompostowni w Raculi i kory sosnowej w stosunku 1:2 [1]. Próbkę złoża wielkości około 1 g wprowadzono do 150 cm³ płynnej pożywki mineralnej (pożywka wg Kojima [2] bez dodatku agaru i ekstraktu drożdżowego), umieszczonej w płuczce o pojemności 250 cm³. Schemat instalacji badawczej przedstawiono na rys. 1. Po kilku dniach zasilania, umieszczonych w płuczkach hodowli, mieszaniną powietrza z MIBK o stężeniu 500 mg/m³ obserwowano wzrost zmętnienia oraz istotne zmniejszenie stężenia MIBK, opuszczającego płuczki. Z zawiesin pobranych z płuczek sporządzono posiew mikrobiologiczny na podłożu Kojami z jedynym źródłem MIBK [2]. Inkubacje prowadziło przez 21 dni w eksykatorze o pojemności 10 dm³, w którym dodatkowo ustawiono naczynko z 5 cm³ MIBK. Po

tym czasie izolowano i namnażano na pożywce MPA firmy Biocorp, różniące się pod względem morfologicznym mikroorganizmy.



Rys.1. Schemat aparatury badawczej; 1 – kolumna nawilżająca, 2 – rotametry, 3 – zawór, 4 – płuczka z MIBK, 5 – port poboru próbek na wlocie, 6 – filtry bakteryjne, 7 – wylot płuczki/pobór próbek, P1 do P4 – płuczki z zawiesiną aktywnych szczepów

2.2. Badanie aktywności degradacyjnej – eksperyment płuczkowy

Biodegradację par MIBK w mieszaninach z powietrzem badano przy użyciu zestawu doświadczalnego, którego trzon stanowił zestaw równolegle zasilanych reaktorów (rys. 1). Na etapie izolacji mikroorganizmów używano w tym celu płuczek pojemności 250 cm³, a w testach kinetycznych płuczek o pojemności 25 cm³. Do każdej z nich wprowadzano 150 lub 10 pożywki mineralnej i dodawano 2 lub 0,5 cm³ inokulum, otrzymywanego metodą splukiwania skosów bakteryjnych 3 cm³ soli fizjologicznej. Przez płuczki przetłaczano mieszaninę par MIBK i powietrza w ilości 3 – 10 dm³/h, przy stężeniach w zakresie 400 – 2700 mg/m³. Celem ochrony hodowli w płuczках, przed zainfekowaniem mikroorganizmami obecnymi w powietrzu, przed płuczkami, na drodze strumienia gazów, zainstalowano filtry bakteryjne Anotop 25 0,2 μm (Whatman). Postęp procesu śledzono metodą chromatograficzną, z wykorzystaniem chromatografu gazowego Chrom 4. W badaniach kinetycznych mierzono też zmętnienie hodowli za pomocą spektrofotometru Spekol 11. W oparciu o wyniki analiz chromatograficznych i dane dotyczące przepływu mieszaniny par MIBK i powietrza przez płuczki obliczano obciążenie masowe płuczki MIBK, całkowitą skuteczność (sprawność) biodegradacji i zdolność eliminacji zanieczyszczeń (właściwą szybkość biodegradacji):

$$M = \frac{G * C_1 * 10^{-3}}{V} \quad (1)$$

$$S_u = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} * 100 \quad (2)$$

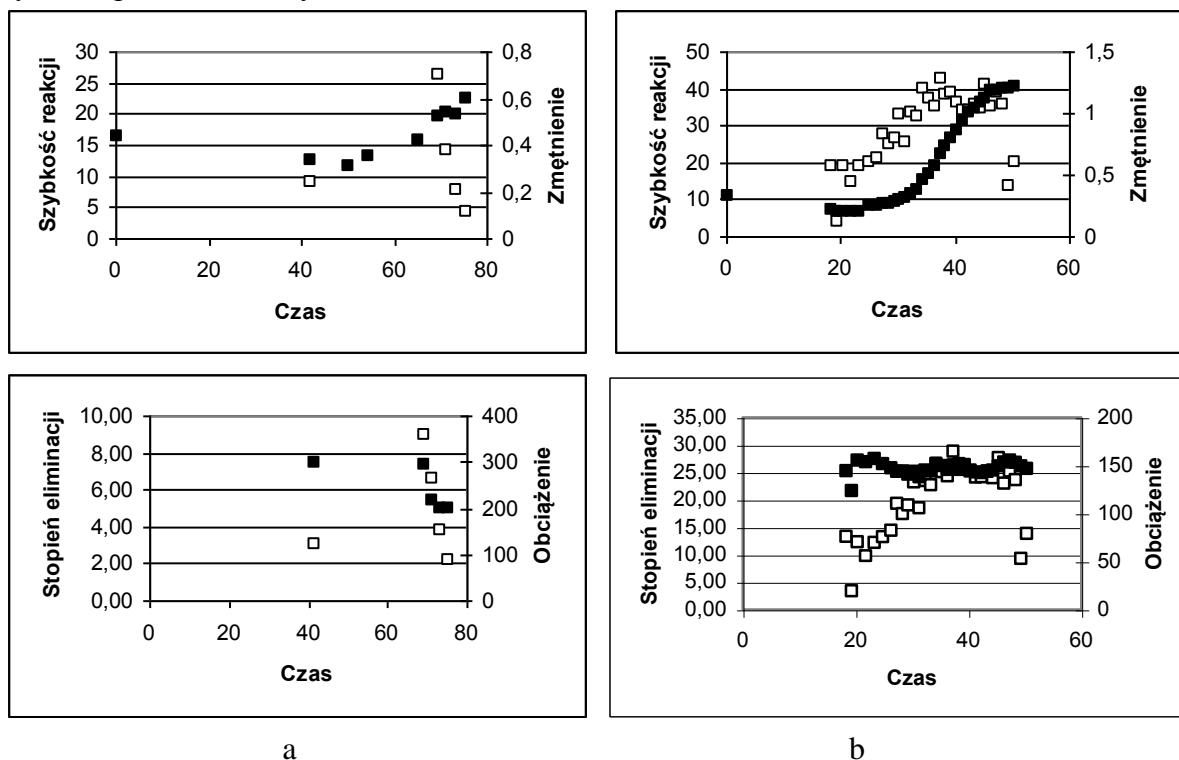
$$EC = \frac{G * (C_1 - C_2) * 10^{-3}}{V} \quad (3)$$

gdzie: C₁ – stężenie MIBK na wlocie/ wylocie, mg/m³;
 G – natężenie przepływu, m³/s;
 V – objętość zawiesiny, m³;
 M – obciążenie masowe płuczki MIBK, g/(m³·s);
 S_u – skuteczność biodegradacji, %;
 EC – zdolność eliminacji zanieczyszczeń, g/(m³·s).

3. Wyniki i dyskusja

W trakcie badań wyizolowano 9 szczepów bakterii, zdolnych do wykorzystywania MIBK jako jedyne źródła węgla i energii. Najaktywniejsze mikroorganizmy zostały zidentyfikowane jako: *Gordonia terrae*, *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus globerulus*, i *Bacillus subtilis* dwoma metodami: MIDI i sekwencjonowania 16S rRNA przez laboratorium Microbial ID (Newark, DE, USA).

Wyniki wstępnych pomiarów kinetyki biodegradacji, wykonane w „dużych płuczkach” jeszcze na etapie izolacji mikroorganizmów, różniły się dość znacząco od wyników uzyskanych w „płuczkach małych”.



Rys. 2. *Gordonia terrae* (a) i *Gordonia bronchialis* (b): □- szybkość reakcji, $g/(m^3 \cdot h)$, stopień eliminacji, % - lewa oś „y”; ■ – zmętnienie, obciążenie, $g/(m^3 \cdot h)$ - prawa oś „y”

Maksymalne szybkości biodegradacji, odnotowane dla szczepów *Gordonia terrae*, *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus globerulus* w dużych reaktorach to 163, 128 i 134 $g/(m^3 \cdot h)$ przy stężeniu MIBK około $2700 \text{ mg}/m^3$, a w reaktorach małych 49, 54 oraz 19 przy stężeniach 901, 527 i $865 \text{ mg}/m^3$. W odniesieniu do szybkości biodegradacji można się było spodziewać wyników odmiennych, ponieważ poniżej pewnego obciążenia, nazywanego obciążeniem krytycznym, powinna zachodzić praktycznie liniowa zależność pomiędzy szybkością biodegradacji a obciążeniem hodowli substratem [3, 4]. Maksymalne obciążenia zastosowane w tej pracy, będące pochodną stężenia, wielkości przepływu gazów i objętości podłoża (pożywki) zwykle były o około 1,5 razy większe w płuczkach małych. Prawdopodobnie obciążenia zastosowane podczas doświadczeń w małych płuczkach były na tyle wysokie, że leżały poza punktem krytycznym co skutkowało spadkiem szybkości i stopnia biodegradacji. Podobne wyniki uzyskali Ziemiański i in. [5]. Stwierdzili oni, że mikrobiologiczny rozkład octanu butylu i butanolu zależy od stężenia początkowego badanych związków oraz od obciążenia substratem. Wzrost tego parametru pogarszał efekty biodegradacji tych związków. Z drugiej strony, stopień eliminacji zdecydowanie wyższy przy doświadczeniach w płuczkach dużych

można tłumaczyć wolniejszym wyczerpywaniem się składników pożywki, mniejszym stężeniem akumulowanych metabolitów lub obu tymi czynnikami łącznie i odwrotnie. Freedman i in. [6] w swoich badaniach potwierdzili, że niedobór azotu i fosforu wpływa na biodegradację związków takich jak: MIBK, MEK, toluen czy p-ksylen. Dodatek tych pierwiastków poprawiał usuwanie wyżej wymienionych substancji ksenobiotycznych. Kolejnym powodem mniejszej aktywności szczepów na etapie pomiarów w małych reaktorach mogło być namnażanie szczepów po izolacji i ich przechowywanie na pożywce z łatwo dostępnym węglem. Przetrzymanywane w takich warunkach szczepy mogły w części utracić zdolność do syntezy niektórych niezbędnych enzymów, a jej przywrócenie wymagałoby ich kondycjonowania w odpowiednio dobranych warunkach [7]. Zjawisko to często obserwowali liczni badacze [8, 9]. Efekt ten mógł być też powodem praktycznej utraty zdolności do rozkładu MIBK przez *Bacillus subtilis* po przechowywaniu.

4. Wnioski

Metyloizobutyloketon jest związkiem który może być stosunkowo łatwo biodegradowalnym w warunkach tlenowych przez bakterie naturalnie występujące w złożach biofiltrów, w tym na przykład przez szczepy z rodzaju *Gordonia sp*, *Rhodococcus sp.*, czy *Bacillus sp*.

Wyizolowane gatunki bakterii *Gordonia terrae*, *Gordonia bronchialis*, *Rhodococcus globerulus* degradowały MIBK z maksymalnymi szybkościami, odpowiednio 163, 128 i 134 g/(m³·h), przy stężeniu MIBK około 2700 mg/m³.

Literatura

1. Wieczorek A., Osóch M., Karcz J.: Eksperymentalna analiza procesu biofiltracji gazów odlotowych w kolumnie ze złożem naturalnym. Inż. Ap. Chem., 2006, 5, 139-141.
2. Kojima Y., N. Itada and O. Hayaishi.: Metapyrocatechase: a new catechol-cleaving enzyme. J. Biol. Chem., 1961, vol. 236, 2223-2229.
3. Wieczorek, A.: Biofiltracja lotnych nierozpuszczalnych ksenobiotyków na złożach kompostowych – czynniki limitujące. ZPPNR, PAN W-wa 2005, 505, 503-511.
4. Deshusses M., Johnson C.: Development and Validation of a Simple Protocol To Rapidly Determine the Performance of Biofilters for VOC Treatment. Environ. Sci. Technol., 2000, 34, 461-467.
5. Ziemiański K., Pielech-Przybylska K., Szopa J. St.: Mikrobiologiczny rozkład wybranych węglowodorów stanowiących zanieczyszczenie powietrza. Rozkład i Korozja Mikrobiologiczna Materiałów Technicznych, Łódź 2001, 274-279.
6. Freedman D. L., Payauys A. M., Karanfil T.: The effect of nutrient deficiency on removal of organic solvents from textile manufacturing wastewater during activated sludge treatment. Environ. Technol., 2005, vol. 26 (2), 179-88.
7. Przybulewska K., Wieczorek A.: Wykorzystanie procesów biodegradacji styrenu do oczyszczania gazów odlotowych. Post. Mikrobiol., 2006, vol. 45, 1, 51-65.
8. Łabużek S., Kłapacińska B., Mrozik A., Radecka I., Woźnica A.: Pozyskiwanie wysoko aktywnej mieszanej populacji drobnoustrojów zdolnych do biodegradacji związków fenolowych. Arch. Ochr. Śr., 1996, vol. 1-2, 49-63.
9. Mrozik, A. and Łabużek, S.: A comparison of biodegradation of phenol and homologous compounds by *Pseudomonas vesicularis* and *Staphylococcus sciuri* strains. Acta Microbiol. Pol., 2002, vol. 51, 367-378.