

# IZOLACJA I KINETYCZNA CHARAKTERYSTYKA BAKTERII ROZKŁADAJĄCYCH STYREN

<sup>1</sup>Andrzej WIECZOREK, <sup>2</sup>Krystyna PRZYBULEWSKA

<sup>1</sup>Politechnika Szczecińska, Al. Piastów 42, 71-065 Szczecin

<sup>2</sup>Akademia Rolnicza w Szczecinie, ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin

[kprzybulewska@agro.ar.szczecin.pl](mailto:kprzybulewska@agro.ar.szczecin.pl)

## STRESZCZENIE

Wyizolowano dwa szczepy bakterii rozkładających skutecznie styren: *Agrobacterium rhizogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*. Degradowały one ten związek z maksymalnymi szybkościami, odpowiednio 110,5 i 98,5 g/(m<sup>3</sup>·h).

### 1. Wstęp

Jednym z bardziej uciążliwych dla środowiska lotnych związków jest styren. Jego światową produkcję w roku 2000 można szacować na około 30 milionów ton [1, 2]. Konkurencyjnym, ze środowiskowego i ekonomicznego punktu widzenia, sposobem ograniczania emisji do atmosfery takich substancji jest wykorzystywanie naturalnych zdolności mikroorganizmów do biodegradacji substancji organicznych [3-6]. Mikroorganizmy pełniące kluczową rolę w centralnym module instalacji oczyszczających oraz optymalne dla ich życia warunki są jednak słabo poznane. Wielekroć uniemożliwia to w pełni świadome projektowanie i kontrolowanie pracy tych urządzeń. W szczególności dla swego wzrostu potrzebują one, oprócz węgla zawartego prawie w każdym zanieczyszczeniu, także azotu, fosforu i siarki koniecznych dla syntezy aminokwasów. Modelowy stosunek pierwiastków biogennych w biomase rozkładanej przez bakterie C:N:P powinien wynosić 200:10:1 [7].

Celem badań było wyizolowanie bakterii rozkładających styren ze złoża biofiltra, wykorzystywanego do oczyszczania powietrza domieszkowanego tą substancją, ich identyfikacja oraz ogólna charakterystyka kinetyki biodegradacji tegoż związku w płynnych pożywkach: bazowej i w pożywkach pochodnych o celowo dobranym składzie.

### 2. Metodyka badawcza

Izolację bakterii ze złoża będącego wypełnieniem biofiltra pilotowego oczyszczającego gazy odlotowe od styrenu wykonano według wcześniej przetestowanych procedur [8-9]. W niniejszej pracy testowano kinetykę biodegradacji styrenu przez dwa najaktywniejsze i najbardziej stabilne szczepy w podłożach o zróżnicowanym odczynie i składnikach pokarmowych.

Identyfikacja wybranych szczepów została przeprowadzona dwiema metodami: badania profili estrów metylowych kwasów tłuszczowych (Fatty Acid Analysis) oraz sekwencjonowania DNA (16S Sequencing) przez Microbial ID (Newark, DE, USA).

Szybkość rozkładania styrenu przez bakterie testowano w ośmiu pożywkach o różnych właściwościach (zmienne pH i zawartość azotu, dodatki specjalne), przy stężeniach styrenu w powietrzu od około 0,37 do 1,8 g/m<sup>3</sup>. Zestaw pożywek stanowiły: bazowa pożywka mineralna i jej modyfikacje, polegające na zmianach proporcji fosforanów Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> bez zmiany sumarycznej zawartości fosforu. Celem tych zabiegów było uzyskanie

innego pH, zmiana zawartości azotu amonowego oraz uzupełnienie pożywki o dodatkowe składniki. Poniżej zamieszczono wykaz tych pożywek, a ich składy zestawiono w tabeli 1.

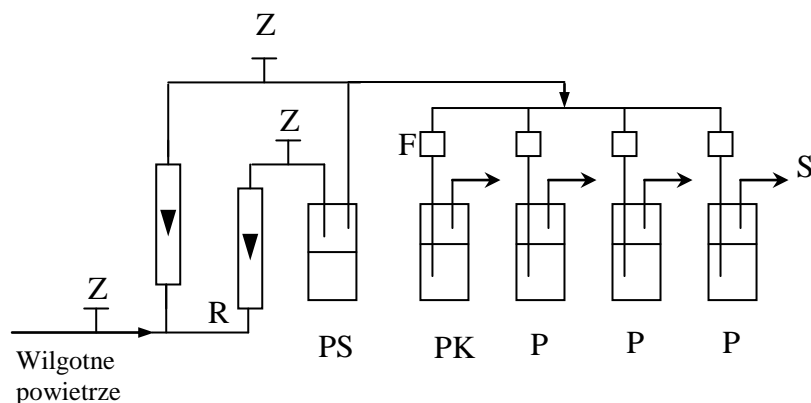
Wykaz pożywek: pożywka mineralna nr 1 (bazowa - odczyn obojętny), pożywka nr 2 (bazowa+ mikroelementy - MiE), pożywka nr 3 (bazowa + wyciąg z kompostu - WK), pożywka nr 4 (bazowa + ekstrakt drożdżowy - ED), pożywka nr 5 (bazowa + glukoza), pożywka nr 6 (obniżony azot), pożywka nr 7 (zasadowa), pożywka nr 8 (kwaśna).

Tabela 1. Składy pożywek

Składnik	1	2	3	4	5	6	7	8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , g	3,78	3,78	3,78	3,78	3,78	3,78	5,10	0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , g	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0	1,94
$\text{NH}_4\text{Cl}$	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	2,00	5,00	5,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , g	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Dodatek	-	MiE 1 cm <sup>3</sup>	WK 200 cm <sup>3</sup>	ED 1,0 g	glukoza 1,0 g	-	-	-
Woda destylowana	do 1000 cm <sup>3</sup>							

Mieszanina mikroelementów (MiE): woda destylowana – 500 cm<sup>3</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 2,5 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub> – 2,5 g; KJ – 0,25 cm<sup>3</sup>; NaBr – 0,25 g; ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O – 0,1 g; Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> · 18 H<sub>2</sub>O – 0,15 g. Przygotowanie wyciągu z kompostu (WK): 500 g kompostu zalewano 750 cm<sup>3</sup> wody i pozostawiano na 24 h w temperaturze pokojowej, po czym sączono przez bibułę. Przesącz uzupełniano wodą destylowaną do 500 cm<sup>3</sup>.

Biodegradację par styrenu w mieszaninach z powietrzem badano przy użyciu zestawu doświadczalnego, którego trzon stanowiły pracujące w układzie równoległym reaktory z zawieszoną mikroorganizmów w płynnej pożywce (rys.1).



Rys. 1. Schemat zestawu badawczego; Z – zawory regulacyjne, R – przepływomierz powietrza; PS – płuczka ze styrenem; PK – płuczka kontrolna, F – filtry bakteryjne; P1-P3 – płuczki z hodowlami bakterii (maks. 9 szt.); S – porty poboru próbek na wlocie

Rolę reaktorów pełniły płuczki Dreschlera pojemności 250 cm<sup>3</sup>. Do każdej z 8 równoległe podłączonych płuczek wprowadzano 150 cm<sup>3</sup> innej pożywki (wg. tabeli 1) i zaszczepiano ją 2 cm<sup>3</sup> zawiesiny wybranego szczepu (inokulum bakterii hodowli zmytej ze skosów przy użyciu 3 cm<sup>3</sup> soli fizjologicznej). Do płuczki 9 – kontrolnej, wprowadzano nie zaszczepioną pożywkę nr 1. Przepływ powietrza przez każdą z płuczek podtrzymywano na poziomie około 10 dm<sup>3</sup>/h, natomiast stężenie styrenu ustalano na poziomie leżącym w podanym wyżej przedziale. Przed płuczkami, na drodze strumienia gazów, zainstalowano filtry bakteryjne Anotop 25

0,2  $\mu\text{m}$  (Whatman), celem zapewnienia sterylności dopływającego powietrza. Stężenie styrenu w strumieniu gazów oznaczano metodą chromatograficzną [10].

W oparciu o wyniki tych analiz i dane dotyczące przepływu mieszaniny par styrenu i powietrza przez płuczki obliczano obciążenie masowe płuczki styrenem, całkowitą skuteczność biodegradacji i zdolność eliminacji styrenu (szybkość właściwą biodegradacji):

$$M = \frac{G * C_1 * 10^{-3}}{V} \quad S_u = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} * 100 \quad EC = \frac{G * (C_1 - C_2) * 10^{-3}}{V}$$

gdzie:  $C_1$  – stężenie MIBK na wlocie/ wylocie,  $\text{mg}/\text{m}^3$ ,  $G$  – natężenie przepływu,  $\text{m}^3/\text{s}$ ,  $V$  – objętość zawiesiny,  $\text{m}^3$ ,  $M$  – obciążenie masowe płuczki MIBK,  $\text{g}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ ,  $S_u$  – skuteczność biodegradacji, %,  $EC$  – zdolność eliminacji zanieczyszczeń,  $\text{g}/(\text{m}^3 \cdot \text{s})$ .

### 3. Wyniki i dyskusja

W trakcie prac wyizolowano 12 szczepów bakterii zdolnych do rozkładu styrenu, występującego jako jedyne źródło węgla i energii. Najbardziej aktywnymi i jednocześnie stabilnymi podczas przechowywania były szczepy *Agrobacterium rhizogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*. Uzyskane podczas eksperymentów w płuczках na pożywkach płynnych wyniki pomiarów kinetyki degradacji styrenu zamieszczono w tabeli 1. Średnie wartości szybkości biodegradacji na stosowanych pożywkach w zakresie stosowanych obciążeń przedstawiono natomiast na rys. 2.

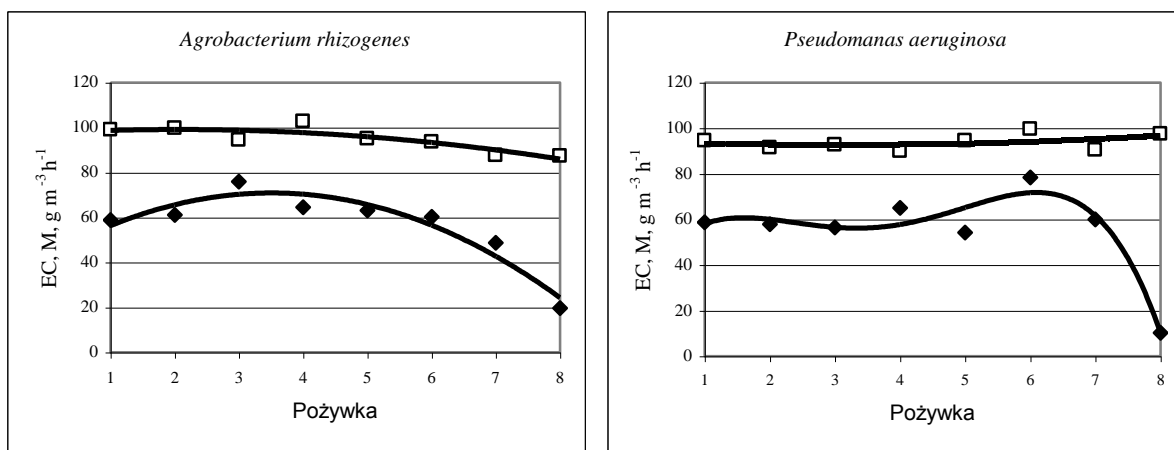
Tabela 1. Równania zależności szybkości biodegradacji (EC) od obciążenia masowego (M)

Pożywka	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1.	$EC = 0,590M - 0,748$	$EC = 0,476M + 12,681$
2.	$EC = 0,645M - 7,946$	$EC = 0,476M + 13,997$
3.	$EC = 0,112M + 39,610$	$EC = 0,487M + 11,894$
4.	$EC = -0,262M + 71,082$	$EC = 0,653M + 5,904$
5.	$EC = 0,235M + 30,472$	$EC = 0,447M + 9,869$
6.	$EC = -0,084M + 47,107$	$EC = 0,593M + 16,007$
7.	$EC = 0,003M + 39,135$	$EC = 0,219M + 31,662$
8.	$EC = -0,266M + 37,819$	$EC = -0,024M + 6,717$

Jak widać z tabeli 1 testowane szczepy, hodowane w pożywce kwaśniej, począwszy od pewnej wartości obciążenia substratem, w ogóle nie wykazywały aktywności, a przy obciążeniach niższych wykazywały jedynie niewielką aktywność.

Dla *Agrobacterium rhizogenes* najlepszą pożywką, z punktu widzenia szybkości biodegradacji styrenu, była pożywka z wyciągiem z kompostu (nr 3). Maksymalna szybkość biodegradacji na niej wynosiła  $110,5 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$ , przy stężeniu wlotowym styrenu równym  $1851,1 \text{ mg}/\text{m}^3$ .

Najwyższą szybkość usuwania styrenu przez *Pseudomonas aeruginosa* odnotowano na pożywce z obniżonym azotem (nr 6). Jej maksymalna wartość  $98,5 \text{ g}/(\text{m}^3 \cdot \text{h})$  została odnotowana dla dwu różnych stężeń styrenu na wlocie do reaktora:  $958,4$  i  $1742,5 \text{ mg}/\text{m}^3$ . Na tej pożywce najwyższą była też sprawność usuwania styrenu zarówno przez *Agrobacterium rhizogenes*, jak i *Pseudomonas aeruginosa*. Tak w przypadku *Pseudomonas aeruginosa*, jak i *Agrobacterium rhizogenes* malała ona wraz ze wzrostem koncentracji styrenu.



Rys. 2. Średnia zdolność eliminacji zanieczyszczeń (EC) i średnie obciążenie masowe (M) podczas biodegradacji styrenu na różnych pożywkach przez *Agrobacterium rhizogenes* – stężenie styrenu około 1302 mg/m<sup>3</sup> (a) oraz *Pseudomonas aeruginosa* – stężenie styrenu około 985 mg/m<sup>3</sup> (b)

#### 4. Wnioski

Wysoką aktywność degradacyjną w stosunku do styrenu i dużą zdolność do przeżycia podczas przechowywania, wykazały dwa szczepy: *Agrobacterium rhizogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*.

Warunki środowiskowe i zawartość podstawowych składników odżywczych w podłożu znacznie wpływają na kinetykę rozkładu styrenu. Obniżenie pH zawsze powodowało spadek szybkości degradacji tej substancji.

Maksymalna szybkość biodegradacji styrenu przez *Agrobacterium rhizogenes* i *Pseudomonas aeruginosa* wynosiła odpowiednio 110,5 i 98,5 g/(m<sup>3</sup>·h).

#### Literatura

1. <http://www.the-innovation-group.com/ChemProfiles/Styrene.htm>.
2. <http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/694.3000/>.
3. Warych J. „Biooczyszczanie Gazów Odlotowych”. Inż. Ekol., 4, Warszawa 2001, 59-67.
4. Szklarczyk M., Czermazowicz M., Adamiak W. „Biologiczne oczyszczanie gazów – stan obecny i perspektywy rozwoju”. Biotechnologia, 1997, vol. 36 (1), 109-116.
5. Barton J. W., Davison B. H., Klasson K.T., Gable C. C. „Estimation of mass transfer and kinetics in operating trickle-bed bioreactors for removal of VOCs”. Environ. Prog., 1999, vol. 2 (18), 87-92.
6. Łebkowska M., Tabernacka A. „Biotechnologiczne metody usuwania zanieczyszczeń z gazów odlotowych”. Biotechnologia, 2000, vol. 50 (3), 141-150.
7. VDI-Richtlinien 3477. Biologische Abgas-/Abluftreinigung - Biofilter. VDI Düsseldorf 1991.
8. Wieczorek A., Przybulewska K.: Screening of microorganisms able to biodegrade ethylbenzene. Environ. Protect. Eng. 2006, vol. 4, 47-52.
9. Przybulewska K., Wieczorek A., Nowak A.: Isolation of Microorganisms Capable of Styrene Degradation. Polish J. Environ. Stud., 2006, vol. 15 (5), 777-783.
10. Wieczorek A.: Pilot-Scale biofiltration of waste gases containing aliphatic and aromatic hydrocarbons, phenol, cresols, and other volatile organic compounds. Environ. Prog., 2005, vol. 24, 60-66.