

Dobrochna GINTER – KRAMARCZYK<sup>1</sup>, Izabela KRUSZELNICKA<sup>1</sup>,  
Joanna ZEMBRZUSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Inżynierii Środowiska,  
Politechnika Poznańska

<sup>2</sup>Instituto Chemii i Elektrochemii Technicznej,  
Politechnika Poznańska

## BIODEGRADACJA WYBRANYCH OKSYETYLENOWANYCH ALKOHOLI PRZEZ ZAADAPTOWANE MIKROORGANIZMY OSADÓW CZYNNYCH

### BIODEGRADATION OF ALCOHOL ETHOXYLATES BY SELECTED ADAPTED MICROORGANISMS FROM ACTIVATED SLUDGE

*Surfactants are commonly found surface water pollution. One of the main components of the stream of surfactants, which are directed to the water environment, are nonionic surfactants. Their main representative is ethoxylated alcohols. Current knowledge on biodegradation of ethoxylated alcohols does not provide information about the microorganism, or group of microorganisms responsible for the biotransformation process. The present study was isolated from activated sludge bacteria with the ability to develop in conditions when a nonionic surfactant active is the sole source of organic carbon. The paths of biodegradation of ethoxylated alcohols were examined and metabolites formed during biodegradation were marked. As a typical alcohol ethoxylate surfactant C12E10 was selected. C12E10 a multicomponent mixture containing homologous series of polydispersial ethoxylates C12Ex series, and C16Ex C14Ex and poly(ethylene glycols) with domination of the series C12Ex. the analyses were carried out in conditions similar to oecd 301E test conditions. The solution containing the surfactant C12E10 as the sole source of organic carbon, which was inoculated with activated sludge, a strain of pseudomonas fluorescens was isolated and identified. The strain kept the biodegradability of alcohol ethoxylates. The progress of biodegradation was monitored tensammetric indirect technique combined with several patterns of separation of surfactant and its metabolites from the aqueous matrix, such as the sequential extraction of the liquid - liquid separation in a trap, and PTFE, and the use of combined techniques of liquid chromatography and mass spectrometry. Pseudomonas fluorescens strain effectively degraded a series of polydispersial ethoxylates C12Ex, C14Ex and C16Ex.*

## 1. Wprowadzenie

Surfaktanty są powszechnie występującym zanieczyszczeniem wód powierzchniowych. Jedną z głównych składowych strumienia związków powierzchniowo czynnych kierowanych do środowiska wodnego w formie środków piorących, czyszczących, emulgatorów, środków pomocniczych itp. są niejonowe surfaktanty [1-2]. Ze względu na skalę produkcji ich głównym przedstawicielem są oksyetylenowane alkohole. Podstawowym procesem decydującym o stężeniu surfaktantów w wodach powierzchniowych jest biodegradacja. Ogólny przebieg biotransformacji oksyetylenowanych alkoholi jest znany. Konsorcjum mikroorganizmów występujące w środowisku wodnym lub w glebie powoduje centralne rozszczepienie prowadzące do powstania poliglikoli etylenowych i alkoholu tłuszczowego [1-3]. Aktualny stan wiedzy na temat biodegradacji oksyetylenowanych alkoholi nie podaje informacji na temat mikroorganizmu bądź też grupy mikroorganizmów odpowiedzialnych za ten proces. Dlatego podjęto badania zmierzające do wyizolowania z osadu czynnego bakterii posiadających zdolność rozwoju w warunkach kiedy surfaktant jest wyłącznym źródłem węgla organicznego. Celem badań było wyizolowanie z osadu czynnego bakterii zdolnych do rozwoju w warunkach, kiedy oksyetylenowany alkohol jest jedynym źródłem węgla organicznego, hodowla tych mikroorganizmów, zbadanie ścieżki biodegradacji oksyetylenowanych alkoholi przez wyizolowany szczep bakterii oraz oznaczenie tworzących się metabolitów. Jako typowy oksyetylenowany alkohol wybrano surfaktant C12E10 nominalnie zawierający łańcuch dodecylowy oraz średnio dziesięć grup oksyetylenowych. Badania przeprowadzono w warunkach zbliżonych do warunków testu OECD 301E [4].

Do identyfikacji wyizolowanych mikroorganizmów zastosowano testy API 20NE.

Postęp biodegradacji surfaktantu i jego metabolitów można kontrolować pośrednią techniką tensammetryczną [5] połączoną z sekwencyjną ekstrakcją w układzie ciecz – ciecz i separacją w pułapce PTFE oraz stosując techniki łączonej chromatografii cieczowej i spektrometrii mas. W prezentowanej pracy skupiono się wyłącznie na omówieniu wyników badań stopnia biodegradacji wykonanych metodą tensammetryczną.

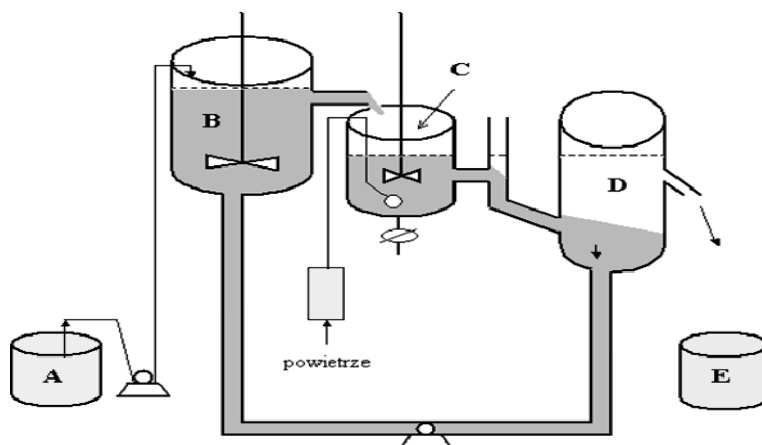
## 2. Część doświadczalna

### 2.1. Wstępne badania biodegradacji

#### 2.1.1. Stabilizacja osadu w warunkach dynamicznych

Początkowo test prowadzono w warunkach dynamicznych z osadem czynnym jako inoculum. Osad pobrano z oczyszczalni ścieków w Szamotułach i poddano go 18-to dniowemu oczyszczaniu w zmodyfikowanym aparacie przepływowym Husmanna [6-8] zachowującym warunki OECD Confirmatory Test (rys.1) w celu całkowitej degradacji surfaktantów mogących pochodzić z oczyszczalni.

- A – zbiornik z pożywką, (zbiornik magazynowy)  
 B – komora denitryfikacyjna,  
 C – komora nitryfikacyjna, (komora napowietrzania)  
 D – odstojnik,  
 E – zbiornik oczyszczonych ścieków,  
 F – pompa perystaltyczna do zawracania osadu czynnego



Rys. 1. Schemat blokowy aparatury do wykonywania testu dynamicznego

Fig. 1. Diagram of apparatus for performing the dynamic test.

Aparat wykonany został w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Politechniki Poznańskiej i składa się z dwóch niezależnych układów, w których jednocześnie prowadzono proces oczyszczania osadu czynnego. Układ zasilany był syntetyczną pożywką mineralną (pożywka wg. Schröbela, pożywka syntetyczna zasilająca bioreaktor w procesie biodegradacji w warunkach dynamicznych: 10mg peptonu, 80mg ekstraktu mięsa, 15mg mocznika, 3,5mg NaCl, 2mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 14mg  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 98mg  $\text{NaHCO}_3$  w 1l pożywki).

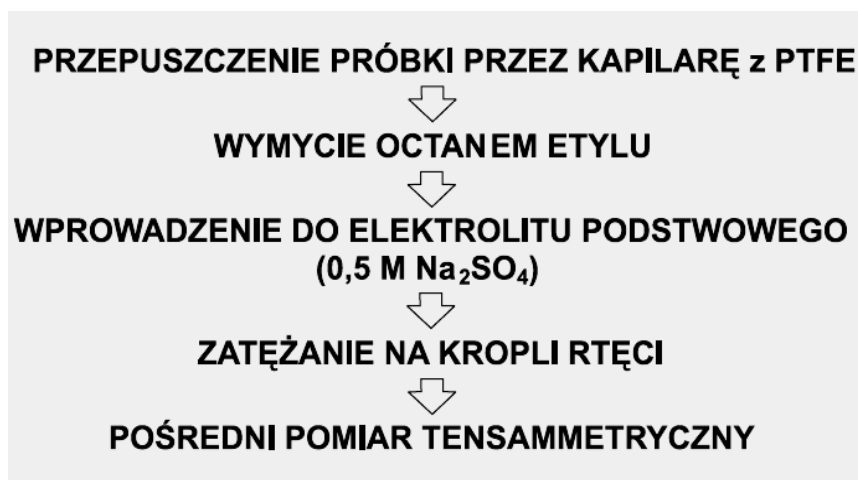
Przez cały okres eksperymentu codziennie kontrolowano temperaturę pożywki i osadu, pH osadu i odcieku, zawartość tlenu w obu komorach oraz szybkość przepływu pożywki i osadu. W trakcie procesu samooczyszczania się osadu dokonano również oznaczenia biochemicznego zapotrzebowania tlenu (BZT<sub>n</sub>), oznaczenia dehydrogenaz i chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) oraz dokonywano systematycznego sprawdzania indeksu osadu. Celem tej fazy testu była stabilizacja osadu czynnego.

### 2.1.2. Badanie biodegradacji w warunkach statycznych

Zastosowany w badaniach surfaktant C12E10 jest typowym poldispersyjnym związkiem powierzchniowo czynnym z grupy oksyetylenowanych alkoholi – najczęściej stosowanym wśród niejonowych surfaktantów. Część hydrofobowa tego związku stanowi łańcuch dodecylowy, a część hydrofilową średnio 10 grup oksyetylenowych.

Po okresie oczyszczenia w teście dynamicznym, z komory napowietrzania pobrano osad w celu przygotowania próbek do eksperymentu w warunkach statycznych. Do każdej szklanej butelki dodano testowanego surfaktantu - C12E10 tak, aby jego stężenie wynosiło 10mg/l, następnie osadu czynnego w takiej ilości aby jego stężenie wynosiło 0,2 g/l (28,7 ml - układ I lub 25,8 ml - układ II osadu czynnego), a w końcowym etapie uzupełniono pożywką mineralną do 200 ml.

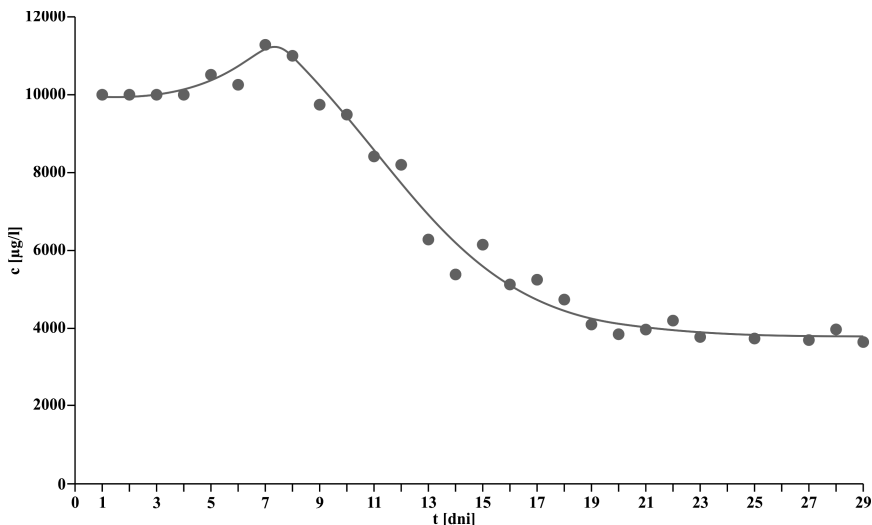
Butelki przykryto gazą umożliwiając swobodny dopływ powietrza i owinięto folią aluminiową żeby chronić przed dostępem światła. Tak przygotowane butelki umieszczono na wytrząsarce. Próbki codziennie przez godzinę wytrząsano w celu lepszego napowietrzania. Podczas trwania testu codziennie pobierano jedną próbkę i poddawano konserwacji dodając 5 ml formaliny. Pomiar stężenia surfaktantu C12E10 przeprowadzono za pomocą pośredniej metody tensammetrycznej ITM (rys.2).



Rys. 2. Schemat procedury pośredniej metody tensammetrycznej ITM [4].

Fig. 2. Scheme of the indirect tensammetric method ITM [4]

W próbkach z wybranych dni trwania testu oznaczono stężenie surfaktantu. Testy statyczne prowadzone były przez okres 30 dni. Na rysunku 3 przedstawiono oznaczone wartości stężeń surfaktantu C12E10.



Rys. 3. Stężenie surfaktantu w czasie trwania testu statycznego.

Fig. 3. The concentration of surfactant during the static test.

W dniu, w którym zaobserwowano gwałtowny spadek stężenia surfaktantu (13–14 dzień) rozpoczęto posiewy mikrobiologiczne, mające na celu wyizolowanie szczepu bakterii powodujących rozkład surfaktantu.

### 2.1.3. Izolacja i identyfikacja mikroorganizmów

Kolejnym etapem badań była próba hodowli i wyizolowania szczepów bakteryjnych oraz ich charakterystyka.

Z wybranych dni testu (13–14 dzień) dokonano posiewów na płytki Petriego metodą 10-krotnych rozcieńczeń, w dwóch powtórzeniach. Izolację prowadzono dwoma technikami: zalewową i powierzchniową. W metodzie zalewowej 1 ml rozcieńczenia zalewano roztworem wzbogaconego agar, natomiast w metodzie powierzchniowej na zastygły agar wprowadzano 0,1 ml rozcieńczenia i rozprowadzano go głaszczką. Bakterie inkubowano w 37°C przez 24 godziny. W obu metodach otrzymano dwa szczepy bakterii z tym, że w metodzie zalewowej nie otrzymaliśmy na żadnej płytce czystych szczepów, co udało uzyskać się w nowatorskiej metodzie powierzchniowej. Czyste szczepy przeszczepiono na skosy i inkubowano przez kolejne 24 godziny w 37°C po tym czasie ze szczepów tych utworzono preparaty barwione metodą Gramma. Obserwacje preparatów pod mikroskopem potwierdziły, otrzymanie dwóch czystych szczepów bakterii na których wykonano biodegradacyjne testy statyczne.

Wyizolowano i zidentyfikowano następujące szczepy bakterii: *Pseudomonas fluorescens*, *Brevundimonas vesicularis*. Do dalszych badań wykorzystano bakterie szczepu *Pseudomonas fluorescens*.

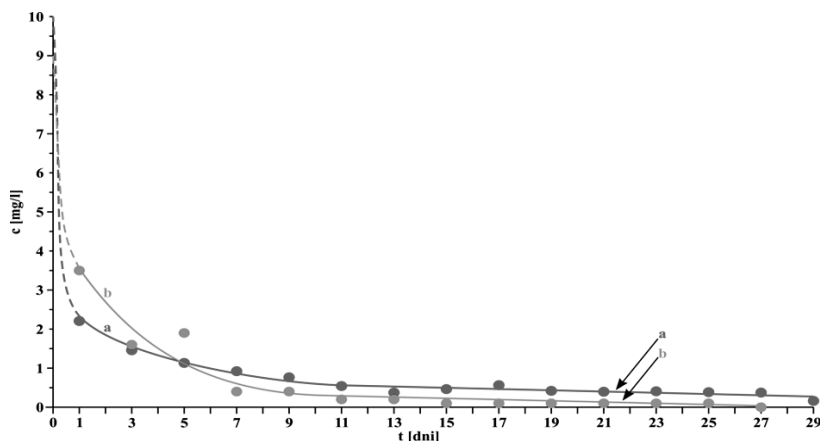
## 2.2. Biodegradacja surfaktantu C12E10 przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* w warunkach gdy surfaktant jest jedynym źródłem węgla organicznego

Przeprowadzono trzy serie testów biodegradacyjnych w celu określenia zdolności biodegradacyjnej wyizolowanego szczepu *Pseudomonas fluorescens* względem surfaktantu C12E10. Sposób przeprowadzenia testu był zgodny z procedurą stosowaną przy wykonywaniu testów statycznych.

We wszystkich seriach testów jako zaszczepkę stosowano bakterie hodowane na pożywkę wg. Schröbela, zawierającej mały dodatek surfaktantu C12E10 (1mg/l), dodawano pożywkę również mineralną o składzie: 1,7mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,3mg K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,7mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 4mg NH<sub>4</sub>Cl, 4,5mg MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 5,5mg CaCl<sub>2</sub>, 0,05mg FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O, 8g MnSO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O, 11,5g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 8,5g ZnSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O, 7g (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> w 200ml próbki. Do każdej kolby testowej wprowadzono surfaktant C12E10 o stężeniu 10mg/l. Pierwsze dwie serie eksperymentów obejmowały okres 1–27 lub 29 dni. W pierwszej serii stosowano 2ml zaszczepki, a w drugiej 20 ml zaszczepki.

W odpowiednim dniu testu kolejne próbki wyjmowano z zestawu, konserwowano 5ml formaliny i poddawano oznaczaniu surfaktantu.

Oznaczanie polegało na przepuszczaniu alikwoty próbki przez pułapkę PTFE, wymyciu zaadsorbowanego surfaktantu C12E10 octanem etylu oraz wykonaniu oznaczenia techniką pośredniego pomiaru tensammetrycznego. Otrzymane wyniki naniesiono na rysunek 4.



Rys. 4. Zmiana stężenia surfaktantu C12E10 biodegradowanego przez bakterie *P. fluorescens*; a) 2 ml zaszczepki bakteryjnej; b) 20 ml zaszczepki bakteryjnej.

Fig. 4. Changing the concentration of surfactant C12E10 removed by the bacteria *Pseudomonas fluorescens*, a) 2 mL of expanded bacteria, b) 20 mL of expanded bacteria.

W celu prześledzenia biodegradacji surfaktantu C12E10 w pierwszych dniach testu, przeprowadzono dodatkowy trzeci test. Był on wykonany identycznie, jak poprzedni w przypadku zaszczepki o objętości 2ml. Obejmował on pierwsze 73 godziny testu.

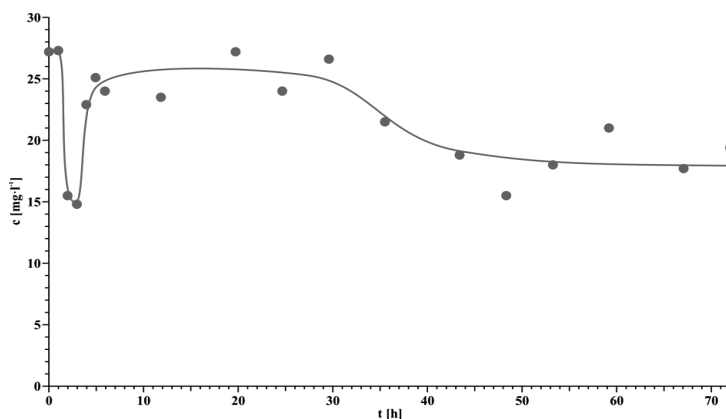
Na rysunku 4 umieszczono dodatkowo wartości uzyskane z kolejnej serii eksperymentu obejmującej pierwsze trzy dni testu. Wyniki te wskazują na bardzo szybką biodegradację pierwotną surfaktantu C12E10 już w początkowej fazie testu. Jednocześnie biodegradacja surfaktantu C12E10 zachodzi szybciej przy większej dawce zaszczepki. Jednak ostateczny stopień biodegradacji uzyskany z zaszczepką zadozowaną w ilości 2ml jest znacznie większy niż ostateczny stopień biodegradacji dla testu z zadozowaną ilością zaszczepki 20ml.

### 2.3. Biodegradacji surfaktantu C12E10 przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* w obecności pożywki organicznej

Biodegradacja testowanego surfaktantu C12E10 w obecności pożywki organicznej jest bardziej reprezentatywna dla warunków panujących w oczyszczalniach ścieków lub w wodach powierzchniowych, niż pod nieobecność pożywki organicznej, kiedy to testowany związek jest jedynym źródłem węgla organicznego.

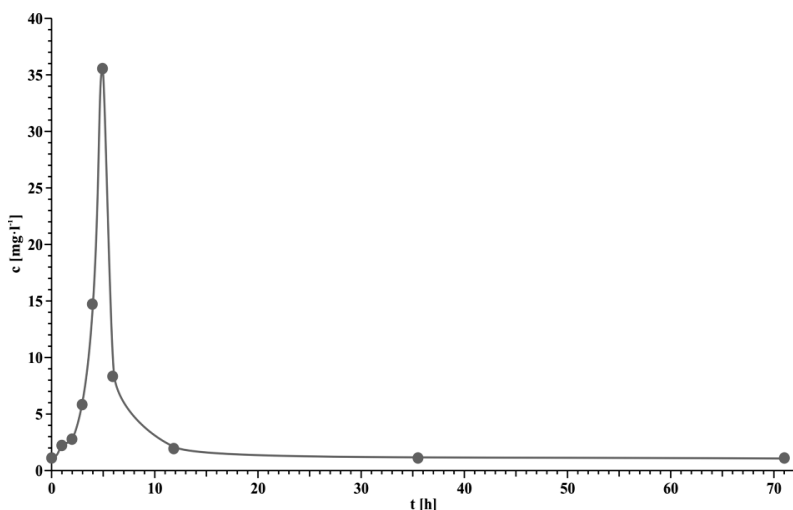
Jako pożywkę organiczną wybrano zestaw syntetycznych ścieków stosowanych w dynamicznych testach biodegradacyjnych, zawierający bulion wołowy, pepton i mocznik. Przeprowadzono kolejną serię eksperymentów wprowadzając do testowanych kolbek pożywkę mineralną, 30% pożywki organicznej odpowiadającej syntetycznym ściekom stosowanym w testach dynamicznych wg. Schröbela, testowany surfaktant C12E10 oraz 1% zaszczepki *Pseudomonas fluorescens* namnożonej w obecności niewielkiego stężenia surfaktantu C12E10. Równoległe prowadzono test kontrolny bez udziału surfaktantu.

Stężenie surfaktantu C12E10 oznaczono również techniką pośredniego pomiaru tensammetrycznego po uprzednim wydzieleniu w pułapce PTFE. Wyniki przedstawiono na rysunkach 6,7,8.



Rys. 6. Zmiana stężenia niejonowych surfaktantów w czasie trwania testu biodegradacyjnego; skład roztworu: 30% pożywki wg. Schröbela, 10mg/l C12E10, 2ml zaszczepki *P. fluorescens* (zaszczepka namnażana na pożywkę wg Schröbela z dodatkiem C12E10-1mg/l)

Fig. 6. Changing the concentration of nonionic surfactants during the test, the composition of the solution: 30% of the medium by Schröbel, 10mg/L C12E10, 2 mL of *Pseudomonas fluorescens* (propagated in a medium with the addition of surfactant C12E10-1mg/L)

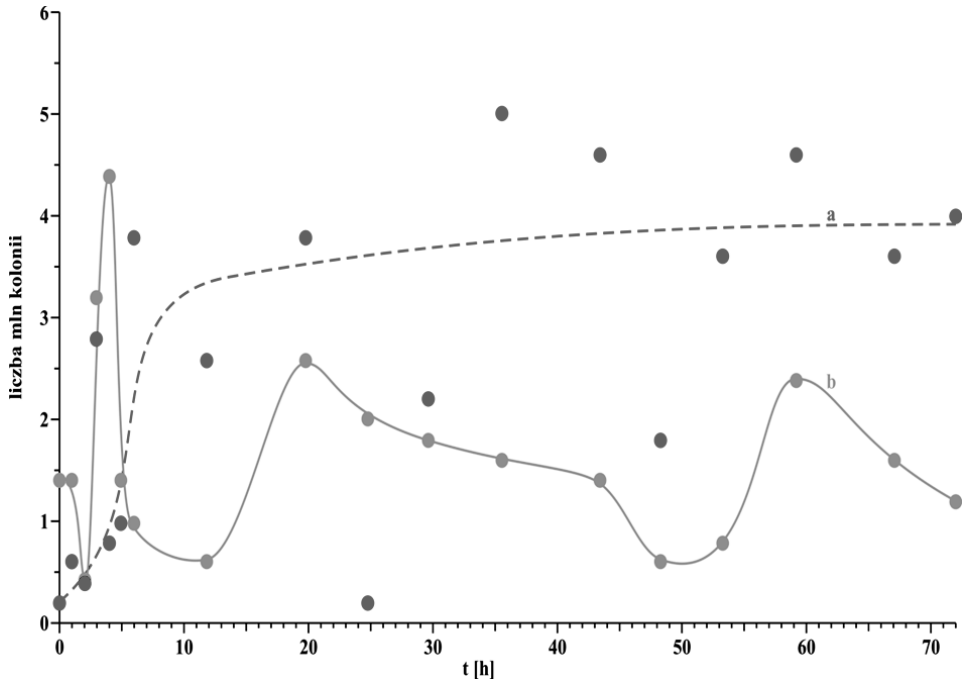


Rys. 7. Zmiana stężenia niejonowych surfaktantów w czasie trwania testu biodegradacyjnego; skład roztworu: 30% pożywki wg. Schröbela, 2ml zaszczepki *Pseudomonas fluorescens* (zaszczepka namnażana na pożywce wg Schröbela z dodatkiem C12E10-1mg/l)

Fig. 7. Changing the concentration of nonionic surfactants during the test, the composition of the solution: 30% of the medium by Schröbel, 2 ml of *Pseudomonas fluorescens* (propagated in a medium with the addition of surfactant C12E10-1mg/L)

Otrzymane wyniki są zaskakujące. W teście kontrolnym prowadzonym pod nieobecność surfaktantu C12E10 w początkowej fazie testu pojawia się bardzo wysoki sygnał świadczący o obecności surfaktantu. Ostre maksimum pojawia się w szóstej godzinie testu a jego wysokość odpowiada 3.5 krotnej dawce testowanego surfaktantu C12E10. Równie zaskakujące są wyniki otrzymane w głównym teście, przedstawione na rys. 7. Przez cały okres trwania testu wyznaczone stężenie surfaktantu C12E10 mieści się znacznie powyżej wprowadzonego stężenia (10 mg/l). Godny odnotowania jest ostry spadek mierzonego stężenia surfaktantu w początkowej fazie testu.





Rys. 8. Liczba kolonii bakterii w czasie trwania testów; a) skład roztworu: 30% pożywki wg Schröbela, 2ml zaszczepki *P. fluorescens* (zaszczepka namnażana na pożywce wg Schröbela z dodatkiem C12E10-1mg/l), b) skład roztworu: 30% pożywki wg Schröbela, 10mg/l C12E10, 2ml zaszczepki *P. fluorescens* (zaszczepka namnażana na pożywce wg Schröbela z dodatkiem C12E10-1mg/l)

Fig. 8. The number of bacterial colonies during the tests; a) the composition of the solution: 30% of the medium by Schröbel, 2mL expanded bacteria of the genus *Pseudomonas fluorescens* (graft propagated in culture medium by Schröbela with C12E10-1mg/L), b) the composition of the solution: 30% of medium by Schröbela, 10mg/L C12E10, 2 mL of bacteria *P. fluorescens* (graft propagated in culture medium by Schröbela with C12E10-1mg/L)

Obserwacja liczby kolonii bakterii uzupełnia spostrzeżenia pozyskiwane na podstawie pomiarów tensammetrycznych (rys. 8). Pod nieobecność surfaktantu w testowanych próbkach obserwuje się szybki wzrost kolonii bakterii w początkowych 10 godzinach testu. W przedziale od 10 do 73 godzin testu liczba kolonii bakterii nie wykazuje gwałtownych zmian.

W obecności testowanego surfaktantu C12E10 w początkowej fazie testu obserwuje się gwałtowny wzrost liczby kolonii bakterii a następnie równie gwałtowny jej spadek. Tworzy się maksimum odpowiadające czwartej godzinie testu. Między 10 a 20 godziną testu liczba kolonii bakterii rośnie a od 20 godziny testu można zaobserwować lekką tendencję spadkową.

Warto zauważyć, że liczba kolonii bakterii w teście prowadzonym w obecności surfaktantu C12E10 jest wyraźnie niższa niż w przypadku badań prowadzonych bez dodatku ZPC.

Obserwowane nieoczekiwane efekty można wyjaśnić tworzeniem biosurfaktantu przez bakterie *Pseudomonas fluorescens*. Tworzący się biosurfaktant zachowuje się podobnie jak testowany surfaktant C12E10 tzn. ulega adsorpcji w pułapce PTFE oraz daje sygnał w technice pośredniego pomiaru tensammetrycznego. W tych warunkach nie można dokonać obserwacji zmian stężenia testowanego surfaktantu C12E10. Dlatego też równolegle prowadzono badania biodegradacji z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią masową.

Badania wykonano w odniesieniu do dwóch testów biodegradacyjnych wykonanych w warunkach, w których surfaktant C12E10 był wyłącznym źródłem węgla organicznego. W pierwszym teście (test 1) stosowano 2ml zaszczepki bakteryjnej *Pseudomonas fluorescens*, a bakterie były namnażane na pożywce wg. Schröbela bez kontaktu z C12E10. W drugim teście (test 2) stosowano 20ml zaszczepki, która była namnażana w warunkach kontaktu z C12E10. Ekstrakty chloroformowe z 1, 5, 9, 15 i 25 dnia obu testów były wprowadzane do aparatu LC-MS. Chromatogramy rozwijano w warunkach gradientu 30:70% 5mM wodnego roztworu octanu amonu i metanolu. Detekcji dokonywano w warunkach wzbudzenia przez elektrorozproszenie oraz w trybie Q1.

### 3. Podsumowanie

Testowany surfaktant C12E10 to wieloskładnikowa mieszanina zawierająca homologiczne szeregi polidispersyjnych etoksylatów serii C12Ex, C14Ex oraz C16Ex, a także poli(glikoli etylenowych). Dominującą jest seria C12Ex. Etoksylaty są biodegradowane przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* co potwierdzono w przeprowadzonym teście.

Analizując uzyskane wyniki można stwierdzić, że we wszystkich przypadkach proces biodegradacji jest praktycznie zakończony w ciągu 10 dni, a szybkość biodegradacji można uszeregować w następujący sposób: C16Ex > C14Ex > C12Ex. Badania chromatograficzne pozwalają na pełną interpretację analizy tensammetrycznej.

### Bibliografia

- [1] Szymański A., Łukaszewski Z., Initial Separation and preservation for long-term storage of non-ionic surfactants from raw and treated sewage, *Water Research*, 2000, 34, 14, 3635- 3639
- [2] Szymański A., Wyrwas B., Jesiołowska A., Kaźmierczak S., Przybysz T., Grodecka J., Łukaszewski Z., Sufactants in the River Warta: 1990-2000, *Polish Journal of Environmental Studies*, (2001, 10, 371- 377
- [3] Szymański A., Wyrwas B., Bubień E., Kurosz T., Hreczuch W., Zembrzuski W., Łukaszewski Z., Biodegradation of oxo-alcohol ehoxylates in the continous flow activated sludge simulation test, *Water Research*, 2002, 36, 3378- 3386
- [4] Wyrwas B., Kruszelnicka I., Ginter-Kramarczyk D.: Wpływ wybranych anionowych i niejonowych związków powierzchniowo czynnych na pracę osadu czynnego, *Przemysł Chemiczny*, 2011, .90, 4, 613-619

- [5] Szymański A., Łukaszewski Z. Indirect tensammetric method for determination of non-ionic surfactants, *Analitica Chimica Acta*, 1992, 260, 25
- [6] EEC (European Economic Community), Draft Directive on the approximation of the laws of the Member States relating to the methods of testing the biodegradability of non-ionic surfactants, Brussels, February, 1976
- [7] Schöberl P., Coupling the ODCE confirmatory test with continuous ecotoxicity tests, *Tenside Detergents*, (1991), 28, 6-14
- [8] Gronenberg C., Schöberl P., Die Erweiterung des modifizierten OECD-Confirmatory - Test um eine vorgeschaltete Denitrifikationsstufe (Extension of the modified OECD- confirmatory- test by an additional denitrifying step), *Tenside Surf. Det.*, 1994, 25, 314-321

