



Biodegradation of chlorotoluene isomers in presence of natural surface active agents.

Wojciech SMULEK, Agata ZDARTA, Ewa KACZOREK

Institute of Chemical Technology and Engineering, Poznan University of Technology, 4 Berdychowo St., 60-965 Poznań, tel. +48 61 665 36 89, e-mail: wojciech.smulek@doctorate.put.poznan.pl

Abstract

Chlorinated derivatives of aromatic compounds are widely used in many industrial branches. Their emission into the environment poses a serious threat to organisms living in it. One of the major methods of their removal from the soil and water are biological methods based on the biodegradation of pollutants by the microorganisms present in the environment. Biodegradation of hydrophobic contaminants may be aided by the use of surfactants. In order to determine the effect of natural surfactants, saponins and rhamnolipids, on chlorotoluene isomers degradation by the soil strain *Pseudomonas fluorescens*, the measurements of chloride ion concentration, the quantity of emitted carbon oxide (IV) and the oxygen consumption of permanganate in liquid culture medium containing the test surfactants at various concentrations were conducted. In the cultures with saponin and o- or p-chlorotoluene was the significant decrease of respiratory activity of microorganisms. However, in the cultures with m-chlorotoluene the saponin addition caused a little increase of CO₂ concentration in headspace of cultures (2.5% in comparison with 2.2% for the culture without any surfactant). The study of oxygen consumption in samples from 10-days cultures indicated positive effect of rhamnolipids addition on biodegradation processes of all chlorotoluene isomers.

Keywords: biodegradation; chlorotoluene; natural surfactants

Streszczenie

Biodegradacja izomerów chlorotoluenu w obecności naturalnych związków powierzchniowo czynnych

Chlorowe pochodne związków aromatycznych są szeroko stosowane w wielu gałęziach przemysłu. Ich emisja do środowiska naturalnego stanowi poważne zagrożenie dla żyjących w nim organizmów. Jedną z głównych metod ich usuwania z gleb i wód są metody biologiczne oparte na biodegradacji zanieczyszczeń przez obecne w środowisku mikroorganizmy. Biodegradacja hydrofobowych zanieczyszczeń może być wspomagana poprzez zastosowanie surfaktantów. Aby określić wpływ naturalnych surfaktantów, saponin i rhamnolipidów, na degradację izomerów chlorotoluenu przez szczep glebowy *Pseudomonas fluorescens* wykonano pomiary stężenia jonów chlorkowych, ilości tlenu węgla (IV) w fazie nadpowierzchniowej oraz utlenialności nadmanganianowej hodowli płynnych zawierających testowane surfaktanty w różnych stężeniach. W hodowlach z saponinami oraz o- lub p-chlorotoleenem nastąpiło znaczne obniżenie aktywności oddechowej mikroorganizmów, podczas gdy w hodowlach z m-chlorotoleenem dodatek saponin w ilości 0,15 g/dm³ spowodował niewielki wzrost stężenia CO₂ w fazie nadpowierzchniowej hodowli (2,5% w porównaniu do 2,2% w hodowli bez surfaktantu). Badania utlenialności próbek z hodowli po 10 dniach prowadzenia biodegradacji pokazały pozytywny efekt dodatku rhamnolipidów na proces biodegradacji wszystkich trzech izomerów chlorotoluenu.

Słowa kluczowe: biodegradacja; chlorotoluen; surfaktanty naturalne

1. Wstęp

Chloropochodne związków aromatycznych są powszechnie wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu, w produkcji farb, lakierów i pestycydów. Wytwarzaniu chlorowanych związków aromatycznych, ich transportowi

i przetwórstwu towarzyszy niekontrolowane przedostawanie się ich do środowiska, do atmosfery, wód powierzchniowych, jak i gleb. Produkcja izomerów chlorotoluenu (głównie *o*-chlorotoluenu) wynosi ponad 60 000 ton rocznie i służą one jako substraty w syntezie środków zmniejszających palność, zmiękczaczy, impregnatów, olejów termicznych czy substancji zapachowych [1]. Chlorowane związki aromatyczne mają tendencję do bioakumulacji, a poprzez toksyczne działanie wywierają negatywny wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. Ich ilość w środowisku ciągle rośnie, dlatego istotne jest ich usuwanie z wód i gleb [2].

Spośród różnorodnych technik remediacji gleb skażonych zanieczyszczeniami węglowodorowymi metody biologiczne pozwalają usuwać toksyczne związki, wykorzystując potencjał biodegradacyjny mikroorganizmów obecnych w środowisku. Jest to metoda bardzo skuteczna i stosunkowo tania, jednak efektywność rozkładu zanieczyszczeń zależy od wielu czynników [3]. Są to między innymi dostępność tlenu oraz makro- i mikroelementów, czy odczyn gleby. Bardzo istotnym parametrem limitującym biodegradację jest niska rozpuszczalność hydrofobowych zanieczyszczeń w wodzie i związana z tym ich niewielka biodostępność dla mikroorganizmów [4].

Jednym z zabiegów zwiększających dostępność biologiczną substratów węglowodorowych jest wykorzystanie surfaktantów. W ich obecności może następować zwiększona desorpcja zanieczyszczeń z gleby, ich emulgacja i transport w micelach oraz modyfikacje właściwości powierzchniowych komórek bakteryjnych. Jednocześnie należy mieć na uwadze możliwe negatywne konsekwencje tej metody, m. in. toksyczność stosowanego surfaktantu w stosunku do mikroorganizmów glebowych. Szczególne zainteresowanie budzą surfaktanty pochodzenia naturalnego, jako związki mniej toksyczne i bardziej biokompatybilne ze środowiskiem naturalnym [5]. Spośród nich największe znaczenie mają ramnolipidy i saponiny.

Ramnolipidy są surfaktantami zbudowanymi z części cukrowej (hydrofilowej), którą tworzą cząsteczki ramnozy oraz części hydrofobowej, jaką stanowi kwas β -hydroksydekanowy. Są one produkowane przez bakterie, głównie z rodziny *Pseudomonas*, np. *P. aeruginosa* [6]. Z kolei saponiny to związki pochodzenia roślinnego, w których część hydrofilową stanowią grupy cukrowe, a hydrofobową grupa steroidowa lub triterpenowa [7].

Celem badań było określenie wpływu surfaktantów naturalnych z grupy saponin i ramnolipidów na proces biologicznego rozkładu izomerów chlorotoluenu. Efektywność biodegradacji została określona z wykorzystaniem pomiarów ilości tlenu węgla (IV) w fazie nadpowierzchniowej hodowli, stężenia jonów chlorkowych oraz utlenialności po biodegradacji.

2. Materiały i metody

2.1. Surfaktanty

Źródłem saponin użytych w badaniach były łupiny tzw. orzechów piorących (*Sapindus mukorossi* L.) zakupione jako środek piorący (EcoShop, Polska). Rozdrobniony surowiec ekstrahowano na gorąco metanolem (w ilości 10 cm³ na 1 g surowca) w aparacie Soxhleta przez 8 godzin. Wydajność ekstrakcji wyniosła 52%. Stosowany preparat ramnolipidów (mieszanina mono- i diramnolipidów) produkowanych przez szczep *Pseudomonas aeruginosa* o nazwie handlowej JBR-425 został zakupiony w Jeneil Biosurfactant Company, USA. Krytyczne stężenie micelizacji (ang. *critical micelle concentration*, CMC) wykorzystanych surfaktantów wyznaczono poprzez pomiary napięcia powierzchniowego ich roztworów o różnych stężeniach. Dla saponin uzyskano CMC na poziomie 0,10 g/dm³, a dla ramnolipidów 0,11 g/dm³.

2.2. Materiał biologiczny i warunki hodowli

Szczep zidentyfikowany biochemicznie jako *Pseudomonas fluorescens* wyizolowany został z gleby skażonej substancjami ropopochodnymi. W badaniach stosowano medium hodowlane o następującym składzie (w g/dm³): 2,79 Na₂HPO₄; 1,00 KH₂PO₄; 1,00 (NH₄)₂SO₄; 0,20 MgSO₄; 0,01 Ca(NO₃)₂·7H₂O; 0,01 cytrynianu żelazamonu; 0,0003 H₃BO₄; 0,0002 CoCl₂·6H₂O; 0,0001 ZnSO₄·7H₂O; 0,00003 Na₂MoO₄·2H₂O; 0,00003 MnCl₂·4H₂O; 0,00002 NiCl₂·6H₂O; 0,00001 CuCl₂·2H₂O. Hodowle o objętości 50 cm³ prowadzono w szklanych zakręcanych butelkach o pojemności 250 cm³, pozostawiając wystarczającą ilość powietrza w fazie nadpowierzchniowej i inkubowano w temperaturze 30°C przez 10 dni. Jako jedyne źródła węgla stosowano izomery chlorotoluenu, których początkowe stężenie wynosiło 4mmol/dm³). Surfaktanty były dodawane w ilościach pozwalających uzyskać ich stężenia w hodowlach na poziomie odpowiednio 0,5 CMC oraz 1,5 CMC. Dla porównania przeprowadzono próby bez dodatku związków powierzchniowo czynnych.

2.3. Pomiary emisji tlenku węgla (IV)

Procentowe stężenie tlenku węgla (IV) w fazie nadpowierzchniowej hodowli było określane przy użyciu aparatu Gas Data LTD GFM Series (Wielka Brytania), który pozwala na określenie procentowego stężenia CH₄, CO₂, O₂, CO i H₂S z dokładnością 0,1%.

2.4. Określenie utlenialności hodowli

Utlenialność hodowli była określana na podstawie utleniania próbek pobieranych po zakończeniu hodowli manganianem (VII) potasu w warunkach kwasowych. Mieszaninę reakcyjną stanowiło 0,1 cm³ próbki, 0,25 cm³ 0,02 M roztworu KMnO₄, 0,5 cm³ 24% H₂SO₄ oraz 4,15 cm³ wody dejonizowanej. Reakcję prowadzono w łaźni wodnej o temperaturze 80°C przez 45 min. Po ochłodzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej wykonywano pomiar absorbancji (UV–VIS Spectrophotometer V–650; Jasco Inc., USA) przy długości fali 525 nm (maksimum absorbancji roztworu wodnego manganianu (VII) potasu).. Wartość utlenialności wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej dla mianowanych roztworów glukozy, dla których utlenialność wyznaczono na podstawie normy [8].

2.5. Analiza zawartości jonów chlorkowych

Jednym z etapów biodegradacji związków chloropochodnych jest reakcja dehalogenacji, w wyniku której od cząsteczki degradowanej substancji odłączany jest atom chloru. W konsekwencji przechodzi on do roztworu w postaci jonu chlorkowego. Stężenie jonów chlorkowych w hodowlach wyznaczano na podstawie reakcji z azotanem (V) srebra metodą opisaną przez Gaikwad i Varma [9], w której zmętnienie próbki jest proporcjonalne do stężenia jonów chlorkowych. Do mieszaniny zawierającej 2,45 cm³ wody dejonizowanej i 0,05 cm³ hodowli po biodegradacji dodawano 0,1 M roztwór azotanu (V) srebra w 3 M kwasie fosforowym (V). Po wymieszaniu wykonywano pomiar przepuszczalności światła przy długości fali 525 nm (UV–VIS Spectrophotometer V–650; Jasco Inc., USA). Krzywą wzorcową zależności przepuszczalności od stężenia jonów chlorkowych wykonano dla mianowanych roztworów chlorku sodu. Stężenie jonów Cl⁻ w medium hodowlanym było poniżej 0,01 mM.

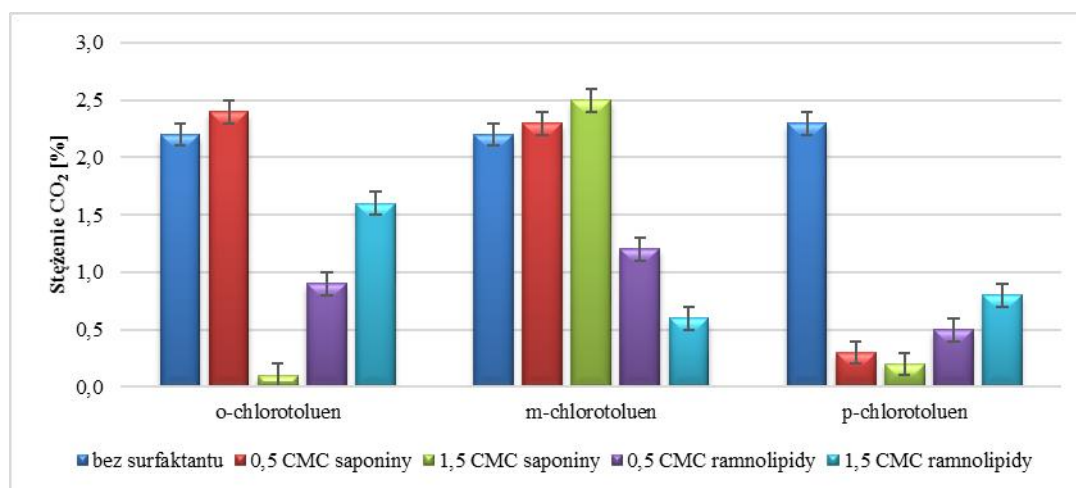
2.6. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach. Obliczenia statystyczne, wraz z wyznaczeniem odchylenia standardowego wykonano w programie Statistica 12 (StatSoft).

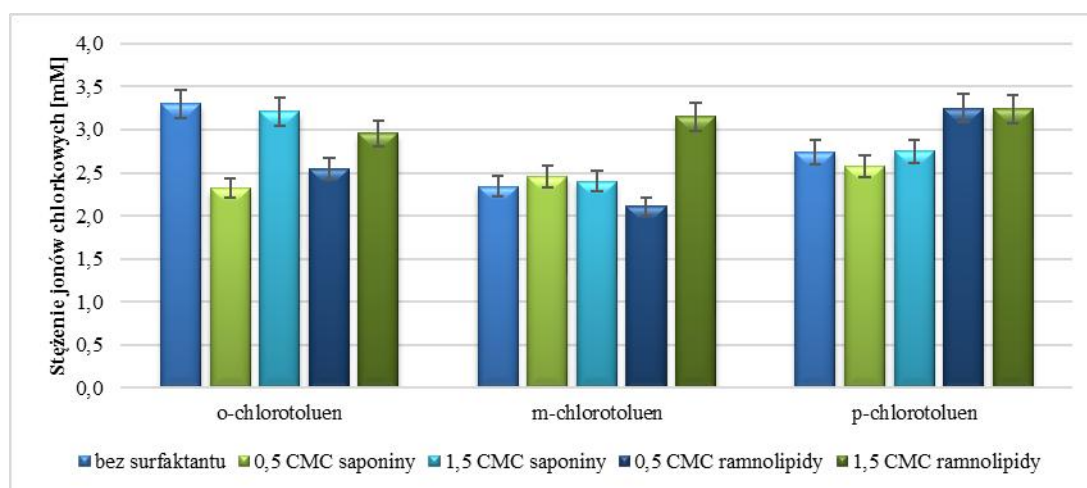
3. Wyniki i ich dyskusja

Stężenie tlenku węgla (IV) w fazie gazowej hodowli w warunkach tlenowych jest proporcjonalne do intensywności procesów oddechowych komórek bakteryjnych w trakcie utleniania dostępnych źródeł węgla oraz stopnia mineralizacji degradowanego związku. Wartości stężeń zmierzone w analizowanych układach zostały przedstawione na rysunku 3.1.

Obecność naturalnych surfaktantów w większości badanych układów wpływała negatywnie na całkowitą mineralizację izomerów chlorotoluenu, zwłaszcza jego izomeru *para*. W porównaniu do hodowli z *p*-chlorotoluenem bez dodatku surfaktantu, gdzie stężenie CO₂ wyniosło 2,3%, w hodowlach z surfaktantami ilość tlenku węgla (IV) nie przekraczała 0,8% (układ z ramnolipidami o stężeniu 0,165 g/dm³ odpowiadającym 1,5 CMC). Zwiększoną emisję CO₂ zaobserwowano w układach z izomerami *orto* i *meta* w obecności saponin, przy czym dla pierwszego związku pozytywne wyniki uzyskano tylko przy stężeniu odpowiadającym 0,5 CMC. Większe stężenie analizowanych surfaktantów powodowało drastyczny spadek stężenia CO₂ w fazie nadpowierzchniowej hodowli.

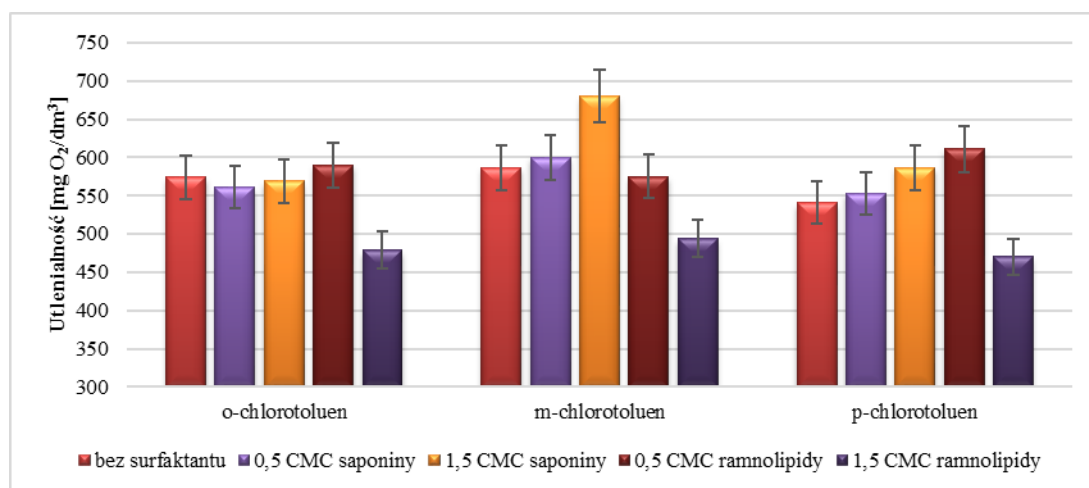


Rys. 3.1. Stężenie tlenu węgla (IV) w fazie nadpowierzchniowej hodowli po 10 dniach biodegradacji.



Rys. 3.2. Stężenie jonów chlorkowych w hodowlach 10-dniowych.

Wyniki pomiarów stężenia jonów chlorkowych powstałych w wyniku biologicznej degradacji chlorotoluenu (katalizowanej przez dehalogenazy) zamieszczono na rysunku 3.2. Porównując otrzymane rezultaty z hodowlami bez dodatku surfaktantu, największy wzrost stężenia jonów Cl⁻ zaobserwowano w hodowlach z rhamnolipidami o stężeniu odpowiadającym 1,5 CMC (dla izomeru *meta* z 2,30 do 3,15 mM, dla izomeru *para* 2,70 do 3,24 mM). Dodatek saponin nie miał istotnego wpływu na zawartość jonów chlorkowych, za wyjątkiem hodowli z izomerem *orto*. Zmierzone stężenie jonów chlorkowych w układzie z saponinami (o stężeniu odpowiadającym 0,5 CMC) było prawie o jedną trzecią niższe niż w hodowli bez dodatku surfaktantów. Ze stechiometrii reakcji wynika, że w wyniku całkowitej dehalogenacji chlorotoluenu powstanie równomolowa ilość jonów chlorkowych. Stąd stężenie jonów chlorkowych na poziomie 3 mM we wszystkich hodowlach (po 10 dniach) wskazuje, że w hodowli zaszła dehalogenacja 75% chlorotoluenu (którego początkowe stężenie wynosiło 4 mM).



Rys. 3.3. Utlenialność hodowli 10-dniowych wyznaczona metodą nadmanganianową.

Wartości utlenialności w przeprowadzonych hodowlach zmieniały się nieznacznie (rysunek 3.3.). Jednakże dla wszystkich izomerów dodatek ramnolipidów w stężeniu $0,165 \text{ g/dm}^3$ (1,5 CMC) skutkował znacznym obniżeniem ilości tlenu potrzebnego do utlenienia próbki. W przypadku *p*-chlorotoluenu zaobserwowano spadek z 540 do $470 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$ (wartości odpowiednio dla hodowli bez surfaktantu i z ramnolipidami o stężeniu odpowiadającym 1,5 CMC).

Na efekt inhibicji biodegradacji węglowodorów w obecności surfaktantów zwrócili uwagę Li i Chen [10], wskazując kilka możliwych mechanizmów. Przyczyną może być wzrost toksyczności biodegradowalnego związku w obecności surfaktantu, trwałe zamykanie zanieczyszczeń w micelach, jak i ukierunkowanie metabolizmu komórek w kierunku degradacji surfaktantu, a nie węglowodoru. Na możliwy różnorodny, zarówno negatywny oraz pozytywny, wpływ naturalnych substancji powierzchniowo czynnych na procesy biodegradacji związków hydrofobowych wskazują również Mohanty i in. [11]. Efektywność biodegradacji jest zależna od rodzaju zanieczyszczenia, surfaktantu oraz szczepów biorących udział w procesie degradacji zanieczyszczeń.

4. Wnioski

Wybrane surfaktanty pochodzenia naturalnego, saponiny i ramnolipidy, nie wpłynęły znacząco na poprawę efektywności biologicznej degradacji chlorotoluenu przez szczep *Pseudomonas fluorescens*. Badania zawartości tlenu węgla (IV) w fazie nadpowierzchniowej hodowli pokazały, że dodatek surfaktantów obniża aktywność oddechową mikroorganizmów. Z kolei pomiary stężenia jonów chlorkowych oraz utlenialności nadmanganianowej wskazały, że niewielki korzystny wpływ mogą wywierać ramnolipidy. W badaniach, poza rolą dodatku surfaktantu, silnie zaznaczył się również wpływ położenia podstawnika chlorowego na biodegradację analizowanych związków, na co wskazują różnice między wynikami otrzymanymi dla poszczególnych izomerów chlorotoluenu.

Badania i publikacja powstały w ramach realizacji projektu "Inżynier Przyszłości. Wzmocnienie potencjału dydaktycznego Politechniki Poznańskiej.", nr POKL.04.03.00-00-259/12, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Literatura

1. Herwijen R., Leeuwen I., 2009. Environmental risk limits for chlorotoluenes (o-chlorotoluene, m-chlorotoluene, p-chlorotoluene), National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven
2. Yamashita N., Urshigawa Y., Masunga S., Walash M. I., Miyazaki A., 2006. Organochlorine pesticides in water, sediment and fish from the Nile River and Manzala Lake in Egypt, International Journal of Environmental Analytical Chemistry. Vol. 77, 289-303
3. Chandran P., Das N., 2012. Role of sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by *Candida tropicalis*, Bioremediation Journal. Vol. 16(1), 19-30

4. Langer O., Palme O., Wray V., Tokuda H., Lang S., 2006. Production and modification of bioactive biosurfactants, *Process Biochemistry*. Vol. 41(10), 2138-2145
 5. Wong J.W., Fang M., Zhao Z., Xing B., 2004. Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions, *Journal of Environmental Quality*. Vol. 33(6), 2015-2025
 6. Abdel-Mawgoud A. M., Hausmann R., Lépine F., Müller M. M., Déziel E., 2011. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production, *Biosurfactants from genes to applications* (red.) Sóberon-Chávez G., *Microbiology Monographs*. Vol. 20, 13 – 57
 7. Chindo B.A., Adzu B., Gamaniel K.S., 2012. Saponins: Properties, Applications and Health Benefits, *Saponins: Structural diversity, properties and applications* (Book Chapter in: *Saponins: Properties, Applications and Health Benefits*), 1-50
 8. PN-P-04896:1984, Metody badań chemicznych - Działy artykuły medyczne - Oznaczenie utlenialności nadmanganianowej
 9. Gaikwad B.G., Varma R.J., 2013. Biodegradation of chlorobenzene and chlorophenols by *Pseudomonas* cultures, *Research Journal of Chemistry and Environment*. Vol. 17(7), 40-43
 10. Li J.L., Chen B.H., 2009. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Materials*. Vol. 2, 76-94
 11. S. Mohanty, J. Jasmine, S. Mukherji, 2013. Practical Considerations and Challenges Involved in Surfactant Enhanced Bioremediation of Oil, *BioMed Research International* Vol. 2013, Article No 328608
-