

Marta HUCULAK¹, Magdalena BOROWIEC¹, Jakub SKUT¹, Krystyna HOFFMANN¹
i Józef HOFFMANN¹

BADANIE TLENOWEJ BIODEGRADACJI ZWIĄZKÓW CHELATUJĄCYCH MIKROELEMENTY NAWAZOWE W ŚRODOWISKU WODNYM W WARUNKACH TESTU STATYCZNEGO

STUDY ON THE AEROBIC BIODEGRADATION OF CHELATING AGENTS IN WATER UNDER THE STATIC CONDITIONS

Abstrakt: Przedstawiono wyniki biodegradacji DTPA i HEEDTA oraz nowych, alternatywnych związków kompleksujących - MGDA i GLDA. Ocena podatności tych związków na biorozkład przeprowadzona została zgodnie z Polską Normą PN-88/C-05561 - Badanie tlenowej biodegradacji związków organicznych w środowisku wodnym w warunkach testu statycznego. Badania wykazały, iż GLDA i MGDA odznaczają się znacznie szybszą i skuteczniejszą biodegradacją niż DTPA czy HEEDTA i w związku z tym mogą zastąpić je z powodzeniem w wielu gałęziach przemysłu.

Słowa kluczowe: biodegradacja, związki chelatujące, test statyczny

Najkorzystniejszą formą podawania roślinie mikroelementów są chelaty. Są to kompleksowe połączenia metalu na określonym stopniu utlenienia z ligandem (chelatorem) bądź ligandami poprzez wiązania koordynacyjne. Przy produkcji tego typu mikronawozów ważne jest, aby zawierały one związki chelatujące, które z jednej strony gwarantują roślinom swobodne wykorzystanie związanych przez nie składników pokarmowych, a z drugiej nie stwarzały zagrożenia dla środowiska. W tym celu konieczne jest poznanie właściwości czynników kompleksujących, a w szczególności ich zdolności do biochemicznego rozkładu [1-4].

Do chelatowania mikroelementów używa się różnych chelatorów. Do najbardziej popularnych syntetycznych związków kompleksujących należą: kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), kwas dietylenotriaminopentaoctowy (DTPA) i kwas *N*-(hydroksyetylo)etylenodiaminotrioctowy (HEEDTA). Badania wskazują jednakże, iż dotychczas stosowane chelatory charakteryzują się niedostateczną biodegradowalnością i nie spełniają podstawowych zasad ochrony środowiska. Ich negatywny wpływ na środowisko i łączące się z tym niebezpieczeństwo dla ludzi sprawiły, iż zaczęto szukać nowych związków, równie lub nawet bardziej skutecznych od nich, a przede wszystkim odznaczających się szybkim i efektywnym rozkładem przez mikroorganizmy. Przykładem takiego biorozkładalnego zamiennika może być kwas metyloglicynodiocowy (MGDA) i kwas dikarboksymetyloglutaminowy (GLDA) [1, 2, 5-8].

Kwas dietylenotriaminopentaocowy - DTPA

Kwas dietylenotriaminopentaocowy (DTPA) to powszechnie stosowany związek chelatujący kationy metali. Ma pięć grup karboksylowych i trzy aminowe z wolnymi

¹ Instytut Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych, Politechnika Wroclawska,
ul. M. Smoluchowskiego 25, 50-372 Wrocław, tel. 71 320 30 39, email: jozef.hoffmann@pwr.wroc.pl

parami elektronów i to za pośrednictwem nich tworzy kompleksy. DTPA ma szerokie zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Wykorzystywany jest do produkcji środków czystości, herbicydów, w przemyśle papierniczym i nawozowym. Ponadto jego zdolność do wiązania, a zarazem usuwania z organizmu substancji radioaktywnych, takich jak pluton, ameryk i kiur, znajduje zastosowanie w medycynie [9-11].

Niewiele wiadomo na temat wpływu tego związku na środowisko naturalne. Niektóre źródła donoszą jednak, iż w przypadku występowania DTPA w dużych stężeniach dochodzi do zahamowania wzrostu mikroorganizmów. Może to sugerować toksyczność tego związku. Co ważniejsze, chelator ten ulega rozkładowi tylko w niewielkim stopniu lub wcale [11, 12].

Kwas *N*-(hydroksyetylo)etylenodiaminotrioctowy (HEEDTA)

HEEDTA należy do kwasów hydroksykarboksylowych i różni się od kwasów aminopolikarboksylowych tym, iż w jego strukturze jedna grupa karboksylowa zastąpiona jest grupą hydroksylową. Taka budowa HEEDTA przyczynia się do zwiększenia jego rozpuszczalności w wodzie [8, 13].

Chelator ten, podobnie jak DTPA, jest związkiem o silnych właściwościach kompleksujących jony metali. Ma też podobne zastosowanie, jednakże jego zużycie na skalę światową jest znacznie mniejsze. Zwykle występuje w postaci trisodowej soli - Na_3HEEDTA [8, 13]. Biochemiczny rozkład tego związku jest trudny i zachodzi powoli. Przypuszcza się, iż stopień jego biodegradacji nie przekracza 20% [8].

Kwas metyloglicynodiocowy (MGDA)

Kwas metyloglicynodiocowy to nowy, syntetyczny chelator tworzący kompleksy o dużej stabilności w szerokim zakresie pH i temperatury. Obecnie stosuje się go już w detergentach, środkach czystości, kosmetykach, przy procesach galwanizacji i w przemyśle tekstylnym [14, 15].

Wiele standardowych testów OECD dowodzi, iż MGDA jest związkiem łatwo biodegradowalnym. Ponadto, w przeciwieństwie do innych chelatorów, biodegradacja MGDA nie wymaga specjalnie przystosowanych mikroorganizmów, a ich rozkład zachodzi w standardowych warunkach zdefiniowanych przez OECD. Po przeprowadzeniu licznych badań toksykologicznych i środowiskowych stwierdzono ponadto, iż MGDA jest całkowicie bezpieczny dla zdrowia człowieka i nie wywołuje negatywnych skutków w środowisku naturalnym [5, 13, 15].

Kwas dikarboksymetyloglutaminowy (GLDA)

GLDA to podobnie jak MGDA, nowy, silnie kompleksujący związek syntetyczny. Charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w szerokim zakresie pH oraz odznacza niebywałą trwałością w wysokich temperaturach. Ponadto nie zaobserwowano, aby jego stosowanie wywołało jakiegokolwiek ekologiczne czy toksykologiczne skutki [16, 17].

Molekuła GLDA zbudowana jest z dwóch grup karboksymetylowych przyłączonych do atomu azotu glutaminianu. Ten syntetyczny chelator został wprowadzony na rynek stosunkowo niedawno i produkowany jest między innymi pod nazwą handlową

Dissolvine® GL. W skład tego produktu wchodzi jednakże tylko L-GLDA, izomer D-GLDA nie ulega bowiem biodegradacji [16-18].

L-GLDA uważa się za związek biorozkładalny. Stopień jego biodegradacji w ciągu 28 dni w teście zamkniętej butelki przekracza 60%. Ponadto udało się wyizolować drobnoustroje zdolne do przeprowadzenia skutecznego rozkładu tego izomeru. Mikroorganizmami biodegradującymi L-GLDA są Gram-ujemne bakterie ze szczepu *BG-1*. Charakteryzują się one 100% homologią z *Rhizobium radiobacter* i w związku z tym zakwalifikowano je do *α -Proteobacteria* [16-18].

Optymalna równowaga pomiędzy stopniem biodegradacji a możliwością tworzenia trwałych kompleksów przez GLDA sprawia, iż związek ten jest doskonałą alternatywą dla konwencjonalnych chelatorów syntetycznych i może być bez zastrzeżeń stosowany w różnych gałęziach przemysłu [16].

Metodyka badań

Ocena biodegradacji związków kompleksujących mikroelementy nawozowe przeprowadzona została zgodnie z Polską Normą PN-88/C-05561 - Badanie tlenowej biodegradacji związków organicznych w środowisku wodnym w warunkach testu statycznego [19].

Przebieg procesu biochemicznego rozkładu tych związków określono na podstawie redukcji stężenia w próbce oraz za pomocą stopnia redukcji ChZT.

Badanie tlenowej biodegradacji związków organicznych w środowisku wodnym w warunkach testu statycznego - PN-88/C-05561

Metoda polega na określeniu stopnia rozkładalności związku organicznego umieszczonego w podłożu mineralnym zaszczerpionym standardowym osadem czynnym. Analiza biodegradacji trwała maksymalnie 20 dni i przeprowadzana była w warunkach tlenowych, w temperaturze pokojowej, bez dostępu światła.

W trzech kolbach umieszczono podłoże mineralne oraz standardowy osad czynny. Do dwóch pierwszych kolb wprowadzono roztwór badanego związku organicznego. Trzecia posłużyła jako próbka kontrolna. W procesie zastosowano ponadto dla porównania glukozę jako czynnik wspomagający biochemiczny rozkład.

Tak przygotowane kolby zakorkowano i zaopatrzone w przewody dostarczające sprężone powietrze. Następnie umieszczono je na mieszadłach elektromagnetycznych, w zacienionym miejscu, w temperaturze pokojowej.

Natychmiast po przygotowaniu próbek i podłączeniu aparatury oraz po 1, 3, 6, 24 godzinie, a następnie codziennie przez maksymalnie 20 kolejnych dni z każdej z trzech kolb pobierano określoną ilość próbki. Po ich odsączeniu wykorzystywane były do oznaczenia stężenia badanego związku i chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT).

ChZT oznaczony został dwiema metodami: nadmanganianową i dichromianową. Stężenie badanych związków określone zostało za pomocą kompleksometrycznej analizy miareczkowej.

Badaniom biodegradacji poddano kwas dietylenotriaminopentaoctowy (DTPA), kwas *N*-(hydroksyetylo)etylenodiaminotrioctowy (HEEDTA) oraz 40% roztwór soli trisodowej kwasu metyloglicynodioctowego, a także 38% roztwór soli tetrasodowej kwasu dikarboksymetyloglutaminowego.

Omówienie wyników badań

Celem prowadzonych badań było określenie stopnia biodegradacji związków kompleksujących stosowanych przy produkcji nawozów mikroelementowych: DTPA i HEEDTA, a także takich substancji, jak MGDA i GLDA, które w przyszłości mogłyby wyprzeć z rynku nawozowego te dotychczas stosowane. Przebieg procesu biochemicznego rozkładu badanych związków określono na podstawie redukcji stężenia oraz za pomocą niespecyficznego wskaźnika ubytku masy, jakim jest stopień redukcji ChZT. Zestawienie wyników biodegradacji dla wszystkich badanych chelatorów przedstawiają tabele 1 i 2.

Tabela 1

Wyniki biodegradacji związków kompleksujących w warunkach testu statycznego bez dodatku glukozy

Table 1

Biodegradation of complexing substances under static conditions without glucose

Badany związek	Stopień redukcji związku [%]	Stopień redukcji ChZT związku [%]	
		Metoda nadmanganianowa	Metoda dichromianowa
DTPA	77,8	32,4	55,5
HEEDTA	45,4	32,7	34,6
MGDA	100 (216 h)	69,2	89,5
GLDA	93,1	42,2	43,9

Tabela 2

Wyniki biodegradacji związków kompleksujących w warunkach testu statycznego z dodatkiem glukozy

Table 2

Biodegradation of complexing substances under static conditions with glucose

Badany związek	Stopień redukcji związku [%]	Stopień redukcji ChZT związku [%]	
		Metoda nadmanganianowa	Metoda dichromianowa
DTPA	79,4	39,2	57,9
HEEDTA	48,5	33,2	35,0
MGDA	100 (192 h)	80,9	96,2
GLDA	94,9	52,2	58,2

Przeprowadzone badania biodegradacji w warunkach testu statycznego wskazują, iż najtrudniej rozkładalnym przez mikroorganizmy związkiem jest HEEDTA. Stopień redukcji stężenia tego związku wynosi 48,5% w obecności glukozy i 45,4% przy jej braku. Obecność glukozy wpłynęła na zwiększenie stopnia biodegradacji HEEDTA tylko w nieznacznym stopniu. ChZT dla HEEDTA, oznaczony zarówno metodą nadmanganianową, jak i dichromianową, uległ natomiast redukcji średnio w około 33%. 10-procentowa różnica między stopniem redukcji stężenia a stopniem redukcji ChZT może sugerować, iż w trakcie rozkładu tego związku mogły powstać produkty przejściowe.

DTPA uległ biodegradacji w około 78%, a glukoza tylko nieznacznie wpływała na stopień redukcji stężenia tej substancji. Z wyników ChZT oznaczanego metodą dichromianową wynika natomiast, iż DTPA ulega biochemicznemu rozkładowi w około 55%, a w przypadku metody nadmanganianowej tylko w około 37%. Nieproporcjonalny spadek oznaczonego ChZT do uzyskanej wartości spadku stężenia DTPA wskazuje na występowanie w próbce pośrednich produktów rozkładu tego związku.

Związek chelatujący - MGDA uległ biodegradacji w 100%. Całkowity rozkład tego chelatora przypadł na 216 godzinę procesu. Wyniki stopnia redukcji ChZT_{Mn} i ChZT_{Cr}

wyniosły odpowiednio około 70÷80%, gdy nie ma dodatkowej glukozy, oraz 89÷96%, gdy jest dodawana.

W przypadku GLDA redukcja związku zachodzi w około 94%, a glukoza tylko nieznacznie wpływa na szybkość redukcji stężenia. Natomiast redukcja ChZT oznaczonego oboma metodami wynosi około 55% w obecności czynnika wspomagającego biodegradację i około 43% przy jego braku. Również w tym przypadku można podejrzewać, iż podczas procesu biodegradacji powstały pośrednie produkty rozkładu GLDA.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań biodegradacji w warunkach testu statycznego można stwierdzić, że:

1. Związki, takie jak DTPA i HEEDTA, czyli te dotychczas stosowane w przemyśle nawozowym, ulegają biodegradacji w zakresie od 45 do 80% w ciągu 20 dni.
2. Najtrudniej biodegradowalnym związkiem okazał się HEEDTA, a jego biochemiczny rozkład wyniósł około 47% i zachodził najwolniej ze wszystkich badanych związków.
3. W przypadku konwencjonalnych chelatorów glukoza nie ma większego wpływu na szybkość ich biochemicznego rozkładu.
4. Badanie biodegradacji stosunkowo nowego związku kompleksującego, jakim jest MGDA, wykazało, iż odznacza się on szybkim i efektywnym rozkładem przez mikroorganizmy. Jego biodegradacja nastąpiła w 100% w czasie krótszym niż 11 dni.
5. Na szybkość biodegradacji MGDA wpływa obecność łatwo dostępnego źródła węgla i energii, jakim jest glukoza.
6. Stopień biodegradacji GLDA jako nowego perspektywicznego związku chelatującego wynosi około 95%, jednakże dużo niższy stopień redukcji ChZT tego związku może świadczyć o powstawaniu podczas jego rozkładu produktów pośrednich.

Literatura

- [1] Fotyma M. i Mercik S.: *Chemia rolna*. WN PWN, Warszawa 1992.
- [2] Gorlach E. i Mazur T.: *Chemia rolna*. WN PWN, Warszawa 2001.
- [3] Klimiuk E. i Łebkowska M.: *Biotechnologia w ochronie środowiska*. WN PWN, Warszawa 2005.
- [4] Kotota E., Komosa A. i Chohura P.: *Wpływ chelatów żelazowych Librel Fe-DP7, Pionier Fe 13 i Top 12 na plonowanie pomidora szklarniowego uprawianego w węglinie mineralnej*. *Acta Agrophys.*, 2006, **3**, 599-609.
- [5] „EDTA na cenzurowanym”. *Przem Chem.*, 1998, **77**(7), 279-280.
- [6] Hoffmann J.: *Biodegradowalność pomocniczych środków chemicznych stosowanych w produkcji nawozów płynnych*. *Pr. Nauk. Polít. Szczecińskiej*, 1998, (547), 102-106.
- [7] Oviedo C. i Rodriguez J.: *EDTA: The chelating agent under environmental security*. *Quim. Nova*, 2003, **6**, 901-905.
- [8] Knepper T.P.: *Synthetic chelating agents and compounds exhibiting complexing properties in the aquatic environment*. *Trends Anal. Chem.*, 2003, **10**, 708-724.
- [9] Hinck M.L., Ferguson J. i Puhaakka J.: *Resistance of EDTA and DTPA to aerobic biodegradation*. *Water Sci. Technol.*, 1997, **35**(2-3), 25-31.
- [10] Egli T.: *Biodegradation of metal-complexing aminopolycarboxylic acids*. *J. Biosci. Bioeng.*, 1998, **92**(2), 89-97.
- [11] Nortemann B.: *Biodegradation of EDTA*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**, 751-759.
- [12] Metsarinne S., Rantanen P., Aksela R. i Tuhkanen T.: *Biological and photochemical degradation rates of dietylenetriaminopentaacetic acid (DTPA) in the presence and absence of Fe(III)*. *Chemosphere*, 2004, **55**, 379-388.

- [13] Hoffmann J., Hoffmann K. i Górecka H.: *Chelaty mikronawozowe w roztworach zawierających makroskładniki nawozowe*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 2004, **502**, 791-795.
- [14] Tzou Y.M., Wang M.K. i Loeppert R.H.: *Effect of N-hydroxyethyl-ethylenediaminetriacetic acid (HEDTA) on Cr(VI) reduction by Fe(II)*. Chemosphere, 2003, **51**, 993-1000.
- [15] BASF Corporation Technical Bulletin: *Methylglycinediacetic acid*. Environ. Sci. Technol., 2004, **38**(3), 937-944.
- [16] Akzo Nobel introduces a new biodegradable chelating agent, www.dissolvine.com, 2007.
- [17] Van Ginkel C.G., Geerst R. i Ngyuen P.D.: *Biodegradation of L-glutamatediacetate by mixed cultures and an isolate*. A.C.S. Symposium series 2005, **910**, 183-194.
- [18] Van Ginkel C.G., Geerst R., Ngyuen P.D. i Plugge C.M.: *Biodegradation pathway of L-glutamatediacetate by Rhizobium radiobacter strain BG-1*. Int. Biodeteriorat. Biodegradat., 2008, **62**, 31-37.
- [19] Polska Norma PN-88/C-05561, Badania tlenowej biodegradacji związków organicznych w środowisku wodnym w warunkach testu statycznego.

STUDY ON THE AEROBIC BIODEGRADATION OF CHELATING AGENTS IN WATER UNDER THE STATIC CONDITIONS

Abstract: Results of biodegradation of DTPA, HEEDTA and new, perspective chelating agent - MGDA and GLDA are showed. The assessment of susceptibility of these compounds to biodegradation was carried out in accordance with the Polish Standard PN-88/C-05561 - Study on the aerobic biodegradation of organic compounds in water under the static conditions. Analysis showed, that GLDA and MGDA are characterized by considerably quicker and more effective biodegradation than DTPA or HEEDTA and in this connection they can replace it with success in many branches of industry.

Keywords: biodegradation, chelating agent, static test