

Agnieszka GAŚCZAK, Elżbieta SZCZYRBA, Grażyna BARTELMUS

e-mail: gaszczak@iich.gliwice.pl

Instytut Inżynierii Chemicznej PAN, Gliwice

Badania kinetyki reakcji biodegradacji lotnych związków organicznych na przykładzie octanu winylu

Wstęp

Biologiczne oczyszczanie gazów jest obecnie jedną z dynamicznie rozwijających się technologii, oferującą tanią i przyjazną dla środowiska alternatywę dla konwencjonalnych metod, takich jak absorpcja, adsorpcja czy spalanie katalityczne. Metody te są polecane wówczas, gdy oczyszczać trzeba duże strumienie powietrza, zawierające małe ilości toksycznych substancji. Ilościowe ujęcie zjawisk zachodzących w bioreaktorach wymaga sporządzenia odpowiednich bilansów masowych i energetycznych. W równaniach bilansowych występuje wyrażenie określające szybkość zużywania określonej substancji w wyniku reakcji biologicznej. Stąd konieczne jest określenie zależności opisującej szybkość asymilacji substratu.

Przedmiotem badań niniejszej pracy była kinetyka mikrobiologicznego rozkładu octanu winylu. Substancja ta, należąca do grupy lotnych związków organicznych VOCs (*Volatile Organic Compounds*), stosowana jest powszechnie w przemyśle do produkcji poliocetanu winylu, który jest składnikiem mas wiążących, klejów, farb emulsyjnych oraz wielu polimerów i kopolimerów. Wraz z alkoholem winylowym, octan winylu jest składnikiem podatnej na biodegradację folii opakowaniowej. Jego roczna produkcja na świecie przekracza 4 miliony ton. Ponieważ jest to substancja umieszczona na liście najbardziej uciążliwych dla środowiska zanieczyszczeń zatem konieczne jest usuwanie jej ze strumieni gazów przemysłowych.

Hodowla okresowa

Badania procesu biodegradacji octanu winylu prowadzono w fermentorze *Biostat B* firmy *Sartorius* o objętości 3l (objętość robocza 2 l), którego wyposażenie umożliwiło kontrolę i utrzymywanie na stałym poziomie parametrów procesowych (pH, natlenienie zawiesiny, obroty mieszadła, temperatura).

W badaniach stosowano bakterie *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123, pochodzące z *Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów* (IITD PAN, Wrocław). Szcep przechowywano w postaci liofilizowanej lub na skosach agarowych, a następnie aktywowano w bulionie i roztworze soli mineralnych zawierającym octan winylu. Zaadaptowane bakterie namnażano i hodowano w kolbach, w środowisku zawierającym 400 ppm octanu winylu, w temperaturze 30°C.

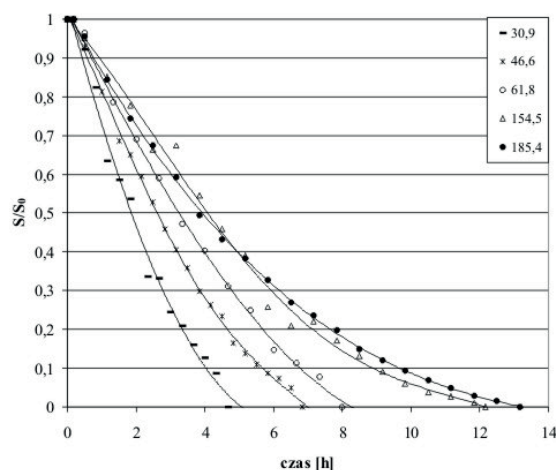
Doświadczenia prowadzono w temperaturze 30°C, przy natlenieniu utrzymywanym na poziomie 5mg·dm⁻³, pH środowiska równym 7 i obrotach mieszadła 300 rpm (są to optymalne dla wybranych mikroorganizmów warunki wzrostu [1]). Po przeprowadzeniu testu sprawdzającego aktywność katalazy zdecydowano, że stałe stężenie tlenu w środowisku będzie utrzymywane poprzez dozowanie roztworu H₂O₂ wg wskazań elektrody pO₂ [2, 3].

Pierwszym etapem pracy było ustalenie szlaku rozkładu badanego zanieczyszczenia. Produktami pośrednimi biologicznego rozkładu octanu winylu są kwas octowy i alkohol winylowy, ulegający natychmiastowej tautomerizacji do aldehydu octowego. Powstały aldehyd ulega utlenieniu do kwasu octowego ale może także być zredukowany do etanolu. Kwas octowy włączany jest w cykl przemian w obrębie cyklu *Krebsa*, a ostatecznymi produktami mikrobiologicznego rozkładu octanu winylu są CO₂ i woda. Szlak ten potwierdzony został badaniami aktywności enzymów zaangażowanych w przedstawiony cykl przemian. Wymienione wcześniej możliwe produkty pośrednie rozkładu (kwas octowy, aldehyd octowy, etanol) nie występowały w próbkach pobranych z ho-

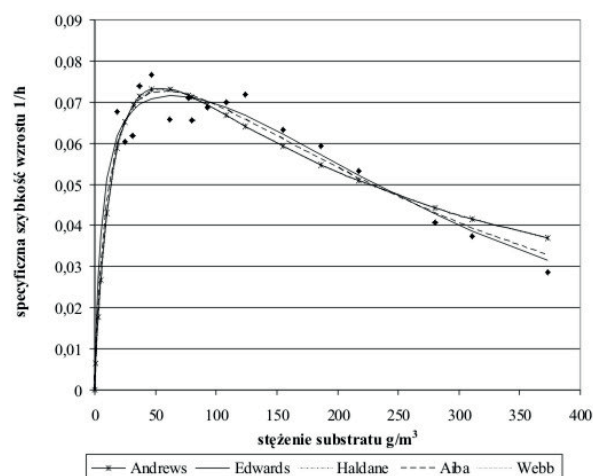
dowli o początkowym stężeniu substratu niższym niż 120 ppm. W pozostałych eksperymentach odnotowywano obecność niewielkich ilości kwasu octowego w płynie hodowlanym.

Dla określenia wpływu zmian początkowego stężenia substratu w roztworze na szybkość jego degradacji przeprowadzono serię eksperymentów dla różnych stężeń początkowych octanu winylu, przy niezmienionych warunkach hodowli. Reaktor wypełniano roztworem soli mineralnych o składzie podanym w pracy [4], a następnie dodawano odwirowane i przemyte bakterie w takiej ilości, aby każdy pomiar rozpoczynał się przy podobnym stężeniu komórek w roztworze (0,000081 g s.m./ml zawiesiny, co odpowiadało absorbancji 0,180 przy długości fali 550 nm).

Po ustabilizowaniu się parametrów procesu dodawano odpowiednią dawkę octanu winylu, który był dla bakterii jedynym źródłem węgla i energii. Hodowlę okresową prowadzono do momentu wyczerpania substratu. W trakcie pojedynczego eksperymentu określano zmianę w czasie stężenia substratu (Rys. 1) (analiza chromatograficzna) oraz zmiany stężenia biomasy (pomiar absorbancji zawiesiny).



Rys. 1. Zmiany stężenia substratu w czasie trwania hodowli okresowych dla różnych stężeń początkowych octanu winylu



Rys. 2. Wpływ początkowego stężenia substratu na właściwą szybkość wzrostu mikroorganizmów

W celu wyznaczenia specyficznego szybkości wzrostu (μ [h^{-1}]) dla każdego punktu eksperymentalnego (początkowego stężenia substratu) sporządzano wykres $\ln X = f(t)$, obrazujący zmianę w czasie stężenia biomasy (X) w trakcie utylizacji określonej dawki substratu (S_0). Ponieważ w okresie wzrostu logarytmicznego właściwa szybkość wzrostu jest stała zatem jej wartość wyznaczyć można z nachylenia prostego odcinka na tym wykresie.

Otrzymane w ten sposób dane przedstawiono na rysunku 2 w formie zależności $\mu = f(S_0)$, której kształt wskazuje na inhibicję wzrostu biomasy przez substrat.

W literaturze [5, 6] znaleźć można wiele propozycji równań opisujących kinetykę wzrostu mikroorganizmów inhibitowaną substratem. W tabeli 1 zestawiono najczęściej stosowane równania.

Tab. 1. Równania opisujące szybkość wzrostu biomasy z inhibicją substratową.

Lp.	Autor	Model
1	Haldane	$\mu = \mu_{\max} S / [S + K_s + (S^2/K_i) + SK_s/K_i]$
2	Andrews	$\mu = \mu_{\max} S / [S + K_s + (S^2/K_i)]$
3	Webb	$\mu = \mu_{\max} S(1+S/K) / [S + K_s + (S^2/K_i)]$
4	Aiba	$\mu = \mu_{\max} S \exp(-S/K_i) / (S + K_s)$

Zgromadzona baza danych eksperymentalnych umożliwiła estymację parametrów równań zestawionych w tabeli 1; wartości wyestymowanych stałych zestawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Wyestymowane stałe równań kinetycznych

Lp.	Autor	μ_{\max}	K_s	K_i	K
1	Haldane	0,1364	19,72	148,63	
2	Andrews	0,1205	17,41	168,35	
3	Webb	0,1205	17,41	168,35	35962081,3
4	Aiba	0,1056	12,51	327,24	

Wszystkie testowane równania umożliwiają opisanie danych eksperymentalnych ze średnim błędem procentowym nie przekraczającym 7%, co zilustrowano na rysunku 2. Ze względu na prostą formę zdecydowano zalecić do dalszych obliczeń równanie Andrews'a. Należy podkreślić, że wobec braku publikacji dotyczących badań kinetyki procesu biodegradacji octanu winylu nie jest możliwe porównanie otrzymanych stałych równań kinetycznych z danymi innych autorów.

Hodowla ciągła

Hodowla ciągła prowadzona była w bioreaktorze przepływowym zasilanym pożywką zawierającą, oprócz soli mineralnych, degradowany związek organiczny. Bakterie, podobnie jak w hodowli okresowej, wprowadzane były do roztworu soli mineralnych zawierającego określoną ilość związku organicznego i inkubowane do momentu osiągnięcia fazy wzrostu logarytmicznego. W tym momencie uruchamiane było dozowanie roztworu ze zbiornika zasilającego i odprowadzanie płynu hodowlanego z reaktora, co umożliwiało utrzymanie stałej objętości płynu hodowlanego w chemostacie.

Przeprowadzono serię pomiarów, w których zmieniano stężenie octanu winylu w roztworze doprowadzanym do chemostatu (15–123 g/m^3).

Zmianę stężenia substratu w reaktorze opisać można zależnością:

$$\frac{dS}{dt} = \mu(S_F - S) - \frac{\mu}{Y_{X/S}} X \quad (1)$$

gdzie S_F (g/m^3) jest stężeniem substratu w strumieniu zasilającym chemostat. Jeśli w układzie osiągnięty zostaje stan ustalony

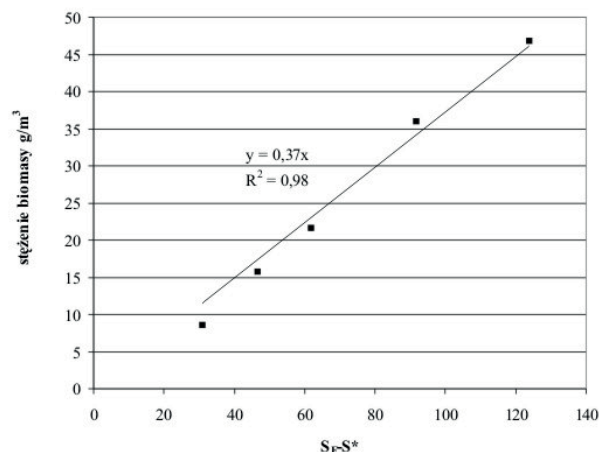
$$\left(\frac{dX}{dt} = 0; \frac{dS}{dt} = 0 \right)$$

wówczas szybkość rozcieńczenia równa jest właściwej szybkości wzrostu ($\mu = D$), a równanie (1) przyjmuje postać:

$$X^* = Y_{X/S}(S_F - S^*) \quad (2)$$

gdzie S^* oznacza stężenie w stanie ustalonym.

Zależność (2) wykorzystać można do wyznaczenia współczynnika wydajności biomasy $Y_{X/S}$. Jeśli bowiem znamy wartości stężenia biomasy (X^*) i substratu (S^*) w stanie ustalonym dla kilku hodowli prowadzonych przy takiej samej szybkości rozcieńczenia (D), lecz różniących się stężeniem substratu w płynie zasilającym chemostat, wówczas z wykresu $X^* = f(S_F - S^*)$ wyznaczyć można współczynnik wydajności $Y_{X/S}$ (współczynnik kierunkowy prostej). Na rys. 3 przedstawiono wyniki serii pomiarowej przeprowadzonej przy stężeniu octanu winylu w dozowanej pożywce zmienianym od 30 do 124 ppm oraz stałej szybkości rozcieńczenia, wynoszącej $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.



Rys. 3. Wyznaczenie współczynnika wydajności z danych eksperymentalnych uzyskanych z hodowli ciągłych dla różnych stężeń początkowych octanu winylu, $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$

Z przedstawionych na rysunku 3 danych eksperymentalnych wyznaczono wartość współczynnika wydajności równą $Y_{X/S} = 0,37$.

Wnioski

Wyniki eksperymentów przeprowadzonych w reaktorze okresowym i chemostacie potwierdziły możliwość biodegradacji octanu winylu przez szczep *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123. Wykazano inhibicję wzrostu komórek przez badany substrat, stąd właściwą szybkość wzrostu biomasy opisano równaniem Andrews'a:

$$\mu = \frac{0,1205 S}{S + 17,41 + \frac{S^2}{168,35}} \quad (3)$$

W oparciu o wyniki eksperymentów przeprowadzonych w chemostacie określono wartości współczynnika wydajności $Y_{X/S}$, który umożliwia transformację opracowanego równania kinetycznego do postaci wymaganej w równaniu bilansu substratu.

LITERATURA

- [1] A. Gąszczak, I. Greń, G. Bartelmus: Prace Naukowe IIC PAN, **8**, 5 (2006)
- [2] J. Pielecki, Z. Targoński: Biotechnologia **60**, 234 (2003)
- [3] S. Fiorenza, Ch. Ward: Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **18**, 140 (1997)
- [4] K. Klepacka, G. Bartelmus, A. Gąszczak, D. Kasperczyk: Chemia-Dydaktyka-Ekologia-Metrologia **VIII**, 1 (2003)
- [5] H. Feitkenhauer, S. Schnicke, R. Mueller, H. Maerkl: Journal of Biotechnology **103**, 129 (2003)
- [6] R. Singh, S. Kumar, S. Kumar, A. Kumar: Biochemical Engineering Journal **40**, 293 (2008)

Praca finansowana z projektu: PBZ-MEiN-3/2/2006.