

## BIODEGRADACJA BENZENU, TOLUENU, KSYLENÓW (BTX-ów) W WARUNKACH ANOKSYCZNYCH

ALICJA MACHNICKA, JAN SUSCHKA

Politechnika Łódzka, Filia w Bielsku-Białej, Zakład Gospodarki i Ochrony Wód,  
ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała

Keywords: BTX, biodegradation, selection of bacteria, anoxic condition.

### BIODEGRADATION OF BENZENE, TOLUENE AND XYLENES (BTX) IN ANOXIC CONDITIONS

Investigations showing the possibility of BTX biodegradation present in the water environment under anoxic conditions have been presented. The effects of transformation of benzene, toluene, o-xylene and p-xylene by indigenous to sewage microorganisms as well as by isolated species of bacteria like *Aeromonas sobria*, *Enterobacter sakazaki*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus lentus* and the mixture of these species varied distinctively. The results and calculated degradation rates have been compared to some results given by other authors. In anoxic conditions all investigated aromates have shown to be biodegradable. The highest rate of degradation was found for isolated species of bacteria from municipal sewage.

#### Streszczenie

W pracy zaprezentowano wyniki badań dotyczące możliwości biodegradacji BTX-ów w środowisku wodnym, w warunkach anoksyicznych. Przedstawiono rezultaty przemian – benzenu, toluenu, o-ksylenu i p-ksylenu – dokonywanych przez bakterie kultur niezdefiniowanych, gatunki wyizolowane i populację składającą się z mieszaniny wyizolowanych gatunków (*Aeromonas sobria*, *Enterobacter sakazaki*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus lentus*). Omówiono przedstawione rezultaty i przedyskutowano wyliczone wartości stałych szybkości reakcji rozkładu aromatów z wynikami innych autorów. Uzyskane wyniki wskazały na możliwości biodegradacji BTX-ów w warunkach anoksyicznych przez badane populacje bakterii, ze szczególną intensywnością przemian dokonywaną przez czyste kultury bakteryjne.

#### WPROWADZENIE

Zagadnieniem intensywnie badanym w ostatnim czasie jest biodegradacja BTX-ów (BTX – Benzene, Toluene, Xylene) w warunkach anoksyicznych i bez-tlenowych.

Warunkiem anoksycznej (beztlenowej) degradacji tych aromatów jest obecność takich akceptorów wodoru i elektronów, jak: azotany, siarczany, związki żelaza na plus trzecim stopniu utleniania, dwutlenek węgla, a także proces metanogenezy [1, 3, 5, 6, 8, 9, 14]. Stwierdzenie to wynika z badań z mieszanymi populacjami lub zdefiniowanymi kulturami mieszanymi, a także z niektórymi wyizolowanymi gatunkami bakterii pochodzącymi z gleb, osadów, ścieków i wód [4, 7, 8, 13]. Aromatyczne związki organiczne typu BTX w warunkach beztlenowych i anoksycznych ulegają procesom utleniania, redukcji, hydrosylacji, dealkilacji, odwodorowania i rozerwania pierścienia aromatycznego. W większości przypadków produktami pośrednimi są: alkohol benzytowy, fenole, kwas benzoesowy, cykloheksan [7, 15]. Produkty te włączane są w szlaki metaboliczne, stając się źródłami węgla i energii dla rozwoju mikroorganizmów. Obecność preferowanych donorów elektronów (glukoza, aminokwasy, octan, kwasy tłuszczowe itp.) może powodować opóźnianie procesów beztlenowej degradacji BTX-ów w środowisku. Również czynnikami hamującymi przemiany są: pH, niska początkowa gęstość aktywnych mikroorganizmów, powolna indukcja enzymów odpowiedzialnych za procesy rozkładu, obecność związków toksycznych, zredukowanych końcowych produktów (np. siarczków), zajście mutacji, a także występowanie w środowisku metanogennym azotanów czy siarczanów [4, 8].

Dotychczasowe badania [11, 12, 16, 17], zmierzające do oceny kinetyki uwalniania BTX-ów do atmosfery oraz przemian w procesach oczyszczania ścieków i przeróbki osadów, doprowadziły m.in. do stwierdzenia całkowicie innych, od uprzednio podawanych, kierunków biodegradacji. Stwierdzono bowiem zjawisko powstawania toluenu jako produktu przejściowego na etapie przechodzenia procesu z fazy fermentacji kwaśnej do metanowej. Zmierzając do rozszerzenia wiedzy o kierunkach i kinetyce przemian BTX-ów w warunkach anoksycznych, przy bardzo złożonej mieszance różnych substratów typowej dla ścieków komunalnych, podjęto badania nad jakościowym składem mikroorganizmów w ściekach, jak również nad przemianami BTX-ów, dokonywanymi przez właściwe dla danych ścieków bakterie.

## MATERIAŁ I METODA BADAŃ

Trzy próby, o niezdefiniowanych kulturach bakteryjnych i o objętości 500 cm<sup>3</sup> każda, zawierały jedną część osadu surowego i trzy części ścieków po oczyszczeniu biologicznym. Każdą z trzech prób zaszczepiono benzenem w stężeniu 1000 µg/dm<sup>3</sup> oraz toluenem w stężeniu 500 µg/dm<sup>3</sup>, p-ksylenem w stężeniu 500 µg/dm<sup>3</sup> i o-ksylenem w stężeniu 500 µg/dm<sup>3</sup>. Jako rozpuszczalnik dla aromatów zastosowano alkohol metylowy. Procesy przemian BTX-ów w warunkach anoksycznych prowadzono w erlenmajerkach, szczelnie zamkniętych gumowymi korkami zaopatrzonymi w cienką rurkę, przez którą mogły wydostawać się gazy. Inkubacja odbywała się w temperaturze pokojowej, w ciemności. W celu sprawdzenia, czy zachodzi powstawanie (synteza) aromatów w próbach, dla

eksperymentu nastawiono próbę kontrolną. Zawierała ona osad surowy i ścieki po oczyszczeniu osadem czynnym w stosunku 1:4, bez dodatku aromatów. Inkubacja przebiegała w warunkach uprzednio podanych.

Trzydzieści trzy próby, każda o objętości 500 cm<sup>3</sup>, składające się z jednej części osadu surowego i z trzech części ścieków po oczyszczeniu biologicznym, poddano sterylizacji w autoklawie, w temperaturze 112°C, przy ciśnieniu 150 kPa, w czasie 30 min. Po przeprowadzonym wyjaławianiu każdą próbę testowano na skuteczność procesu sterylizacji, wykorzystując w tym celu agar wzbogacony.

Następnie próby szczepiono wyizolowanymi z badanych ścieków czystymi kulturami bakteryjnymi: *Aeromonas sobria*, *Enterobacter sakazaki*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus lentus* oraz populacją będącą mieszaniną wymienionych gatunków bakterii.

Hodowlę drobnoustrojów prowadzono w termostacie w temperaturze 27°C, na podłożu krwawym. Po okresie hodowlanym kolonie zmywano z pożywki roztworem soli fizjologicznej w ilości 1 cm<sup>3</sup> i przenoszono do wysterylizowanych prób. Zaszczepiony materiał pozostawiano na okres 9 dni w temperaturze pokojowej, celem namnożenia się drobnoustrojów i zużycia przez bakterie rozpuszczonego tlenu. Po okresie inkubacji określono liczbę bakterii i własności fizykochemiczne mieszaniny.

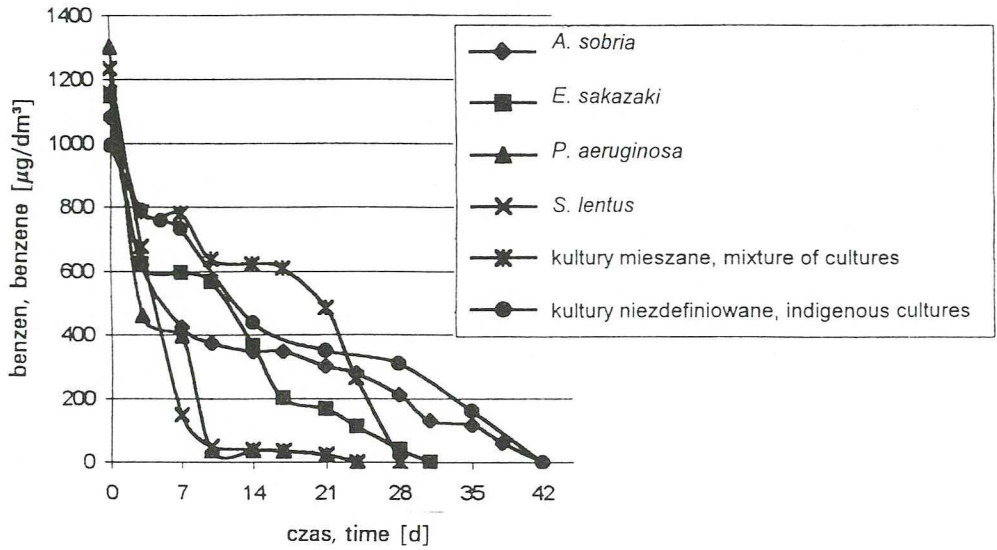
Następnie każdą z prób zaszczepiono aromatami: benzen w stężeniu 1000 µg/dm<sup>3</sup>, toluen w stężeniu 500 µg/dm<sup>3</sup>, p-ksylen w stężeniu 500 µg/dm<sup>3</sup> i o-ksylen w stężeniu 500 µg/dm<sup>3</sup>. W celu sprawdzenia, czy dochodzi do zmian stężeń aromatów w próbach, dla eksperymentu nastawiono próbę kontrolną: I kontrola – zawierała ścieki zaszczepione czystą hodowlą jednego gatunku lub mieszaniną gatunków bakterii, II kontrola – zawierała wysterylizowane ścieki z dodanymi w wyżej wymienionych stężeniach lotnymi węglowodorami aromatycznymi (benzen, toluen, p- i o-ksylen).

Wszystkie próby badane w eksperymencie (również i te z kulturami niezdefiniowanymi), bezpośrednio po dodaniu aromatów, analizowano za pomocą chromatografii gazowej, celem stwierdzenia rzeczywistego stężenia BTX-ów w próbce. Następnie próby umieszczono w wytrząsarkach, w temperaturze pokojowej, w ciemności.

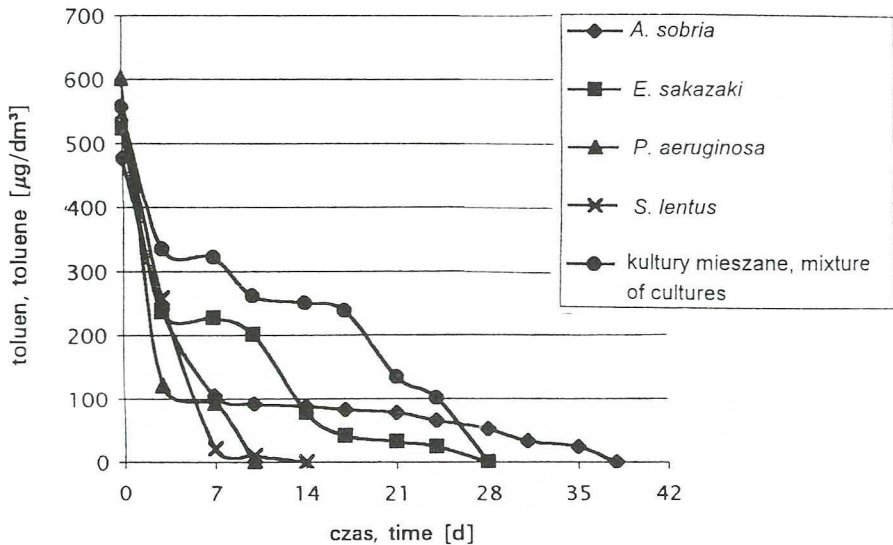
Do analizy procesów transformacji aromatów wykorzystano chromatograf gazowy Hewlett Packard HP 6890 series GC system, wyposażony w kolumnę kapilarną HP5 – 5% Phenyl Methyl Siloxane o długości 30 m i FID (Flame Ionization Detector). Gazem nośnym był azot (2,4 cm<sup>3</sup>/min). Temperatura początkowa w przebiegu analizy wynosiła 35°C i wzrastała w tempie 30°C/min do temperatury 200°C. Całkowity czas oznaczenia wynosił 11,8 min.

## WYNIKI

Badane populacje bakterii wykazywały aktywność w przemianach BTX-ów zachodzących w warunkach anoksylicznych. Szczególnie intensywną biodegradację aromatów przeprowadziły wyizolowane gatunki bakterii (Rys. 1–4).

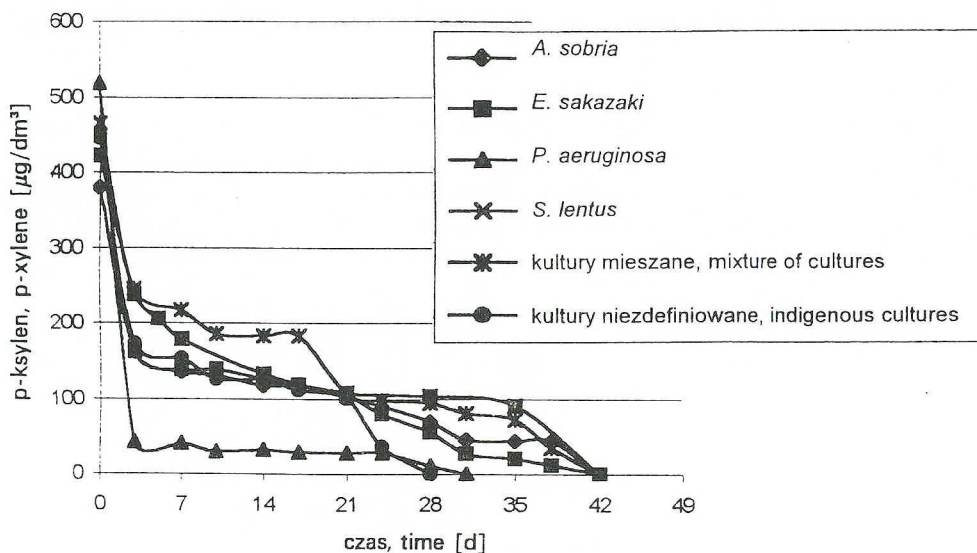


Rys. 1. Biodegradacja benzenu przez wyizolowane mikroorganizmy i ich mieszaninę  
Benzene biodegradation by selected microorganisms and their mixture

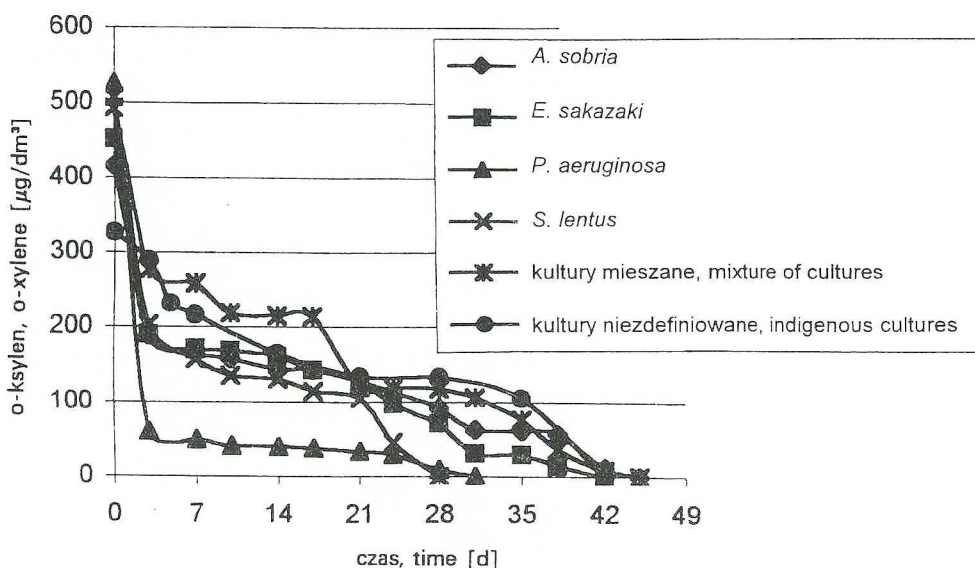


Rys. 2. Biodegradacja toluenu przez wyizolowane mikroorganizmy i ich mieszaninę  
Toluene biodegradation by selected microorganisms and their mixture

Poszczególne populacje charakteryzowały się jednak różnicami w intensywności degradacji aromatów. Przykładowo, najaktywniej w warunkach anoksycznych proces przemian benzenu i toluenu prowadziły bakterie gatunku *P. aeruginosa*. Już w 10. dobie trwania eksperymentu skonstatowano całkowity rozkład toluenu (Rys. 2). Benzen natomiast uległ biodegradacji w 24. dobie (Rys. 1).



Rys. 3. Biodegradacja p-ksylenu przez wyizolowane mikroorganizmy i ich mieszaninę  
p-Xylene biodegradation by selected microorganisms and their mixture

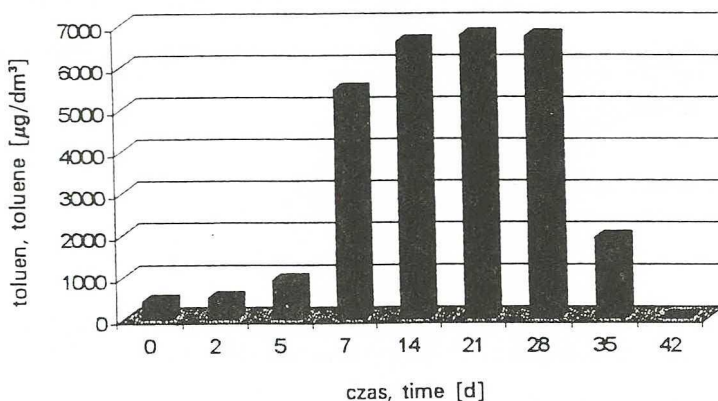


Rys. 4. Biodegradacja o-ksylenu przez wyizolowane mikroorganizmy i ich mieszaninę  
o-Xylene biodegradation by selected microorganisms and their mixture

Z kolei populacja *S. lentus* najaktywniejsza była w stosunku do p- i o-ksylenu (Rys. 3 i 4). Bakterie *S. lentus* dokonały całkowitej transformacji obydwu ksylenów podczas 24 dób. Stosunkowo wolniej prowadziły przemiany BTX-ów bakterie *E. sakazaki*, *A. sobria* i populacje kultur mieszanych (*A. sobria*, *E. sakazaki*, *P. aeruginosa*, *S. lentus*) (Rys. 1–4).

Zdecydowanie wolniej procesy biodegradacji przeprowadzały bakterie kultur niezdefiniowanych (Rys. 1–4).

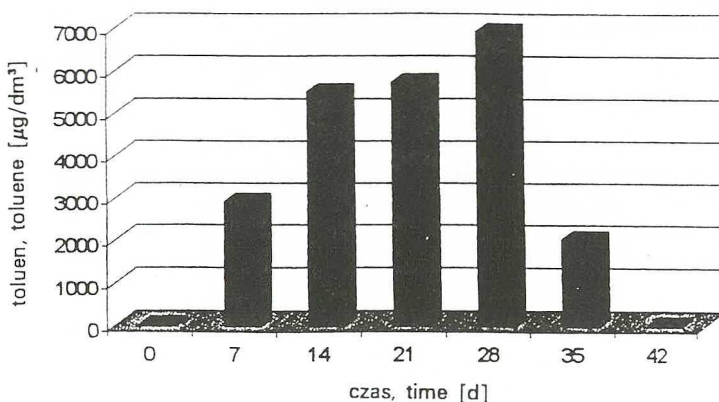
W procesie transformacji toluenu w warunkach anoksycznych, zachodzącym przy udziale bakterii kultur niezdefiniowanych, stwierdzono zjawisko powstawania toluenu jako produktu przejściowego (Rys. 5). W pierwszej fazie trwania eksperymentu odnotowano gwałtowny wzrost stężenia toluenu z  $397 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  (stężenie zadane w dniu zerowym) do  $6735 \mu\text{g}/\text{dm}^3$  w 28. dniu inkubacji. W drugiej fazie natomiast stwierdzono jeszcze gwałtowniejszy rozkład tego związku, aż do jego całkowitej biodegradacji w 42. dniu eksperymentu.



Rys. 5. Produkcja toluenu w warunkach beztlenowych przez populację mikroorganizmów ścieków komunalnych

Production of toluene under anaerobic condition by the population of indigenous to municipal sewage microorganisms

Prowadząc badania dotyczące przemian BTX-ów, dokonywano także oznaczeń stężeń aromatów w próbach kontrolnych. Skonstatowano, że w środowisku badanych populacji bakterii w warunkach anoksycznych nie powstawały BTX-y, z wyjątkiem próby z bakteriami kultur niezdefiniowanych. W badaniu kontrolnym zawierającym bakterie niezdefiniowane – do którego również nie dodawano żadnego z badanych aromatów – odnotowano początkowy wzrost stężenia toluenu, a następnie całkowity jego rozkład (Rys. 6).



Rys. 6. Produkcja toluenu w próbie kontrolnej  
Production of toluene in the control

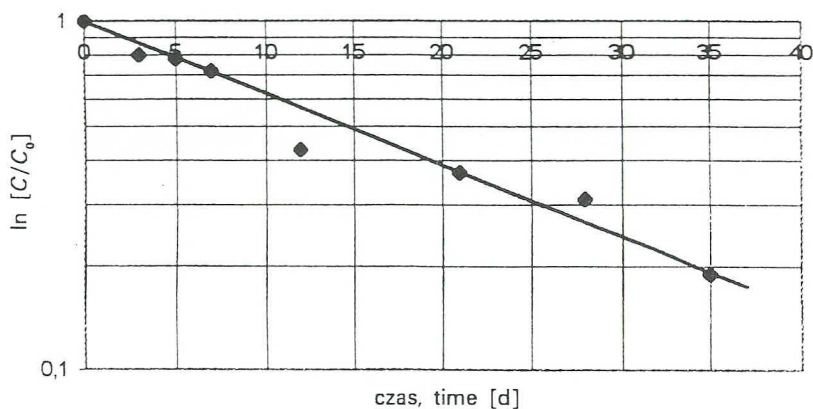
## DYSKUSJA

Wyizolowane populacje bakteryjne i ich mieszaniny oraz kultury niezdefiniowane były aktywne w przemianach BTX-ów w warunkach anoksycznych. Stwierdzono jednocześnie ich różną aktywność.

W warunkach anoksycznych stwierdzono większą specyfikę wyizolowanych czystych kultur w stosunku do populacji niezdefiniowanej. Wyróżniającą aktywnością cechowała się populacja *P. aeruginosa* w odniesieniu do benzenu i toluenu (Rys. 1 – 2), natomiast w stosunku do o-ksylenu i p-ksylenu najaktywniejszy był *S. lentus* (Rys. 3 – 4).

Zgodnie z oczekiwaniami mniejsze są prędkości rozkładu węglowodorów w warunkach anoksycznych w porównaniu do prędkości rozkładu węglowodorów w warunkach tlenowych.

Dla kultur niezdefiniowanych, prowadzących – przykładowo – biodegradację benzenu w warunkach anoksycznych, obliczony współczynnik szybkości reakcji  $k$  wynosił  $0,046 \text{ [d}^{-1}\text{]}$  (Rys. 7), podczas gdy dla tej samej populacji w warunkach tlenowych –  $k=2,5 \text{ [d}^{-1}\text{]}$ .



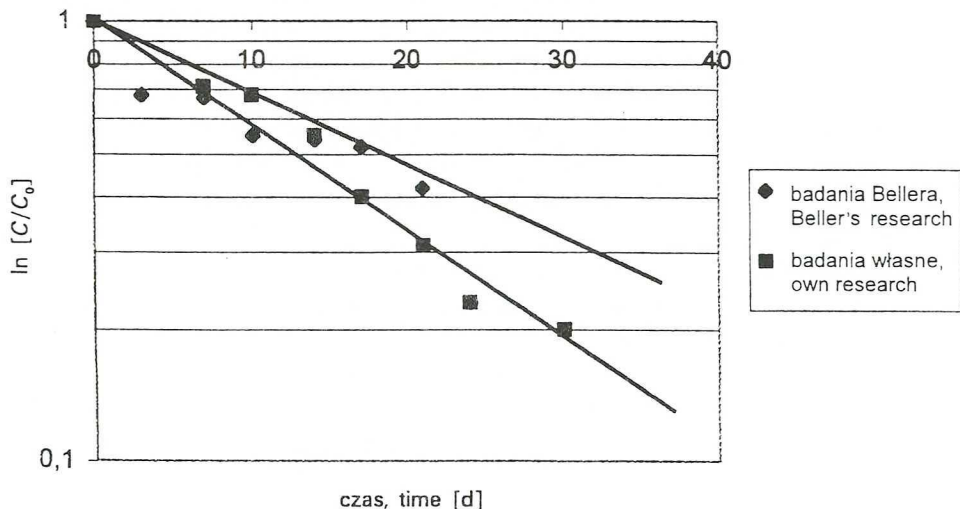
Rys. 7. Biodegradacja benzenu w warunkach anoksycznych w populacji mikroorganizmów ścieków komunalnych (kultury niezdefiniowane)

Benzene biodegradation under anoxic condition by the population of indigenous to municipal sewage microorganisms (non defined culture)

W uzyskanych wynikach badań dotyczących warunków anoksycznych stwierdzono większą szybkość rozkładu benzenu i ksylenów przez wyizolowane kultury bakterii od szybkości uzyskanej dla mieszaniny i zespołu kultur niezdefiniowanych. Przykładowo – wyliczona w sposób jak wyżej – dla *S. lentus* wartość  $k$  wynosi dla benzenu  $k = 0,050 \text{ [d}^{-1}\text{]}$ .

Również w przypadku o-ksylenu i p-ksylenu stwierdzono większą szybkość rozkładu wyizolowanych bakterii aniżeli dla kultur niezdefiniowanych, a nawet dla populacji mieszanej. Uzyskana dla kultur mieszanych szybkość rozkładu p-ksylenu przedstawiona została na rysunku 8. Na rysunku tym, dla porówna-

nia, przedstawiono również uzyskane przez Bellera i in. [2] wyniki rozkładu p-ksylenu w wodzie gruntowej w warunkach beztlenowych.



Rys. 8. Biodegradacja p-ksylenu – badania Bellera i in. [2] i własne  
p-Xylene biodegradation – results of own investigations and given by Beller et al. [2]

W badaniach własnych uzyskano w przybliżeniu szybkość rozkładu  $k = 0,037 \text{ [d}^{-1}\text{]}$ .

Badania Bellera i in. [2], realizowane dla innego środowiska, pozwalają na określenie wartości współczynnika  $k = 0,030 \text{ [d}^{-1}\text{]}$ , a więc wartości zbliżonej do otrzymanej we własnych badaniach. Paraleli uzyskanych wartości współczynnika  $k$  dokonano przede wszystkim dla podkreślenia porównywalności wyników badań własnych z wynikami w innych ośrodkach naukowych.

W trakcie prowadzonych badań stwierdzono – wcześniej już zauważone [11, 12, 15, 16] – zjawisko powstawania toluenu w środowisku populacji niezdefiniowanych bakterii ściekowych (Rys. 5 i 6). Znamienne jest, że toluen jako produkt pośredni powstawał na etapie przechodzenia procesu transformacji z fazy fermentacji kwaśnej do metanowej. Na możliwość powstawania toluenu w wyniku procesów biologicznych wskazali jedynie Juttner i Henatsch [10]. Stwierdzili oni powstawanie toluenu w wodach jeziora w hypolimnionie w warunkach „stagnacji” w okresie jesiennym. Toluen wzrastał w pobliżu dna jeziora. Juttner i Henatsch [10] przypuszczają – powołując się na pracę Pona i in., którzy wykorzystując kultury *Clostridium aerofoetidum* stwierdzili wytwarzanie toluenu z fenyloalaniny (kwas fenylo- $\alpha$ -aminopropionowy) zawartej w białkach – że toluen może powstawać z tego właśnie związku.

Nie można więc wykluczyć podobnego prekursora toluenu w osadach ściekowych, stanowiących substrat w naszych badaniach.



## WNIOSKI

1. W warunkach anoksylicznych stwierdzono większą specyfikę wyizolowanych czystych kultur (gatunków) w stosunku do populacji bakterii niezdefiniowanych.

2. Wyróżniającą aktywnością cechowała się populacja *P. aeruginosa* w odniesieniu do benzenu i toluenu, natomiast w stosunku do p-ksylenu i o-ksylenu najaktywniejszy był *S. lentus*.

3. Bakterie charakteryzowały się różną aktywnością enzymatyczną w przemianach BTX-ów w warunkach tlenowych oraz anoksylicznych. W warunkach tlenowych zdecydowanie większą aktywnością cechowała się populacja kultur niezdefiniowanych w stosunku do gatunków i populacji kultury mieszanej, natomiast w warunkach anoksylicznych intensywniej przemiany prowadziły czyste kultury (gatunki).

4. Powyższe wnioski mają istotne znaczenie praktyczne – potrzeba poszukiwania i stosowania czystych kultur w warunkach anoksylicznych (beztlenowych) ze względu na niewielkie ilości powstającej biomasy, pominięcie uciążliwości związanej z napowietrzaniem i możliwość wykorzystania w gospodarce powstającego metanu.

## LITERATURA

- [1] Beller H.R., D. Grbić-Galić, M. Reinhard: *Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and influence of iron on the process*, Appl. Environ. Microbiol., **62**, 1188–1196 (1992).
- [2] Beller H., W.-H. Ding, M. Reinhard: *By products of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of in situ bioremediation*, Environ. Sci. Technol., **29**, 2864–2870 (1995).
- [3] Beller H.R., A.M. Sporman, P.K. Sharma: *Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulfate-reducing bacterium*, Appl. Environ. Microbiol., **62**, 1188–1196 (1996).
- [4] Edwards E.A., D. Grbić-Galić: *Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions*, Appl. Environ. Microbiol., **58** (8), 2663–2666 (1992).
- [5] Edwards E.A., D. Grbić-Galić: *Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by methanogenic consortium*, Appl. Environ. Microbiol., **60**, 313–322 (1994).
- [6] Edwards E.A., L.E. Wills, M. Reinhard: *Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions*, Appl. Environ. Microbiol., **58** (3), 794–800 (1992).
- [7] Grbić-Galić D., T.M. Vogel: *Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures*, Appl. Environ. Microbiol., **53**, 254–260 (1987).
- [8] Hutchins S.R.: *Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor*, Appl. Environ. Microbiol., **57**, 2403–2407 (1991).
- [9] Hutchins S.R., G.W. Sewell, D.A. Kovacs: *Biodegradation of aromatic hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions*, Environ. Sci. Technol., **25**, 68–76 (1991).
- [10] Juttner F., J.J. Henatsch: *Anoxic hypolimnion as significant source of biogenic toluene*, Nature, **323**, 797–798 (1986).

- [11] Kuzmider G., I. Kolonko, J. Suschka: *Lotne związki organiczne w ściekach komunalnych*, Arch. Ochr. Środow., **23**, 91–104 (1997).
- [12] Kuzmider G., B. Mrowiec, I. Kóbiesia, J. Suschka: *Uwalnianie lotnych związków organicznych ze ścieków do atmosfery*, Arch. Ochr. Środow., **23**, 79–90 (1997).
- [13] Machnicka A., J. Suschka: *BTX degradation – the difference in behavior of selected microorganisms in aerobic and anaerobic condition*, Appl. Environ. Microbiol. (in press).
- [14] Major D.W., C.I. Mayfield, J. Dolfing: *Biotransformation of benzene by denitrification in aquifer sand*, Ground Water, **26**, 8–14 (1988).
- [15] Schink S.C.: *Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures*, FEMS Microbiol. Ecol., **31**, 69–77 (1985).
- [16] Suschka J., B. Mrowiec, G. Kuzmider: *Volatile organic compounds (VOC) at some sewage treatment plants in Poland*, Wat. Sci. Tech., **33**, 273–276 (1996).
- [17] Suschka J., A. Machnicka: *Selected and mixture of cultures activity in BTX biodegradation*, Wat. Res. (in press).

Wpłynęło: 21 lutego 2000, zaakceptowano do druku: 10 lipca 2000.