

BIODEGRADÁCIA BENZÉNU BAKTÉRIAMI OCTOVÉHO KVASENIA V BIOFILTRI

VLADIMÍRA BILSKÁ^a, SLÁVKA FERIANCOVÁ^a
a JOZEF GRONES^b

^a Výskumný ústav ropy a uhl'ovodíkov, Vlčie hrdlo, 842 12 Bratislava 23, ^b Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4, Slovenská republika grones@fns.uniba.sk

Došlo 14.12.04, prepracované 7.7.05, prijaté 16.7.05.

Kľúčové slová: *Acetobacter*, benzén, biofiltrácia, biodegradácia

Úvod

Kontrola emisných plynov vypúšťaných do prostredia patrí medzi prioritné ciele všetkých priemyselných producentov. Pre dosiahnutie tohoto cieľa sa vyvíjajú nové technológie s vyššou účinnosťou zachytávania a likvidácie škodlivých látok vypúšťaných do prostredia^{1,2}. Jednou z efektívnych metód na zachytávanie a likvidáciu škodlivín je aj zaradenie biofiltrácie do technologického postupu³. Základnou podmienkou tohoto procesu je využit' skupiny baktérií, pre ktoré nie je odpadný produkt toxický a baktéria ho dokáže metabolizovať, pričom účinnosť takéhoto procesu sa musí pohybovať v rozsahu 90–99 % (cit.^{4–6}). Biofiltrácia je založená na imobilizácii baktérií na pevnú fázu, cez ktorú prechádzajú znečisťujúce látky, ktoré sú kontinuálne odbúravané.

Nové enviromentálne štúdie využívajú širokú paletu mikroorganizmov pri biodegradácii priemyselných produktov, medzi ktoré zaraďujeme rôzne oleje, organické rozpúšťadlá, pesticídy a herbicídy^{7,8}. V biodegradačných experimentoch dominujú baktérie rodu *Pseudomonas*, ktoré majú na svojom genóme alebo na plazmidoch lokalizované operóny (*tol* operón) kódujúce skupiny enzýmov podieľajúcich sa pri biodegradácii mnohých organických látok^{9,10}. Pri biodegradácii benzénu sa využíva skupina mikroorganizmov prevažne rodu *Pseudomonas*, ktoré sú schopné produkovať enzýmy oxidujúce benzén, benzén dioxigenázu a *cis* benzén glykol dehydrogenázu, pričom výsledným produktom je katechol, ktorý priamo vstupuje do metabolických dráh bunky¹¹.

Baktérie rodu *Acetobacter* patria medzi gramnegatívne striktné anaeróbne baktérie, pre ktoré je charakteristická schopnosť oxidácie alkoholu a rôznych sachari-

dov. Pre vysokú schopnosť degradácie sacharidov sa už od pradávna využívajú octové baktérie pri výrobe octu, sú súčasťou fermentačných kultúr pri výrobe vína, piva a ich schopnosť sa využíva pri biokonverzii sacharidov, pri príprave vysoko čistej celulózy¹² a acetánu^{13,14}. V poslednom období sa niektoré kmene *Acetobacter* využívajú aj pri bioremediačných prácach pri degradácii niektorých organických látok pripravovaných z ropy, ktoré sa po svojom využití stávajú zdrojom znečistenia v prírode^{10,15}. Octové baktérie boli na základe metabolických pochodov dlhý čas zaraďované do čeľade *Pseudomonaceae* a až v poslednom období boli preradené do novovytvorenej čeľade *Acetobacteriaceae*, čo predurčuje ich podobné enzymové vybavenie ako mali baktérie v pôvodnej skupine¹⁶.

V predchádzajúcich prácach sme ukázali^{10,15}, že baktérie rodu *Acetobacter* sú schopné metabolizovať benzén a využívať ho ako zdroj energie pre svoj ďalší rast. Využitie týchto baktérií pri biodegradácii benzénu v poloprevádzkových bioreaktoroch a porovnanie účinnosti degradácie s baktériami COV1 izolovanými z aktivovaných kalov, bolo základným cieľom predloženej práce.

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene

Bakteriálne kmene *Acetobacter pasteurianus* použité v experimentoch pochádzajú zo Zbierky mikroorganizmov na Katedre molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave. Zmesná kultúra baktérií COV1 izolovaná z čističky odpadných vôd je zo zbierky VÚRUP v Bratislave.

Kultivačné médiá a kultivácia baktérií

Kmene *Acetobacter pasteurianus* boli kultivované na médiu YPM (5 g kvasničný autolyzát, 3 g peptón, 0,1 % benzén na 1 000 ml média) pri teplote 28 °C a baktérie COV1 na kultivačnom médiu M (10 g kvasničný autolyzát, 10 g peptón, 5 g NaCl, pH 7,2 na 1 000 ml média) pri teplote 37 °C na rotačnej trepačke Heidolph Unimax 1010 pri 180 ot min⁻¹. Pri príprave pevných médií sme pridávali 20 g agaru na liter média. Mediá boli suplementované benzénom do koncentrácie 0,1 %. Počas biofiltrácie sa do bioreaktora pridávali minerálne živiny (médiu 10 krát MM: 104,9 g K₂HPO₄, 54,4 g KH₂PO₄, 40 g (NH₄)₂SO₄, 5 g kvasničný autolyzát a 10 ml anorganických solí na 1 liter média zložených z 5 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,5 g MnSO₄ · 7 H₂O, 0,0125 g FeSO₄ · 7 H₂O, 0,05 g CaCl₂ s výsledným pH 7,4).

Príprava inokula na biofiltráciu

Baktérie z aktivovaného kalu COV1 boli pripravované na pracovisku biotechnológie a ekoprocesov Slovnaft VÚRUP v Bratislave. Z aktivovaného kalu boli selektované baktérie, ktoré boli schopné rásť v prostredí

so zvýšenou koncentráciou benzénu. Inokulum buniek COV1 bolo pripravené kultiváciou na médiu MM s prídavkom benzénu do výslednej koncentrácie 0,1 % na rotačnej trepačke pri 180 ot min⁻¹ pri teplote 37 °C do absorbancie A_{590} 0,9–1,0 (čo je $5,4 \cdot 10^8$ buniek na ml).

Inokulum buniek kmeňov *Acetobacter pasteurianus* 3612 a *Acetobacter pasteurianus* 3614 bolo pripravené 24 hodinovou kultiváciou v kultivačnom médiu YPM, do ktorého sa pridával benzén do výslednej koncentrácie 0,1 % na rotačnej trepačke pri 180 ot min⁻¹ pri teplote 28 °C do absorbancie A_{590} 0,9–1,0 (čo je $4,9 \cdot 10^8$ buniek na ml).

50 ml pripraveného inokula bolo aplikované na nosič biofiltra v jednotlivých experimentoch injekčnou striekačkou zvrchu kolóny nadol.

Prežívanie baktérií v biofiltre sme stanovovali odberom 100 mg aktívneho uhlia v päť dňových intervaloch. Vzorka bola suspendovaná v 2 ml sterilnej vody a po odfiltrovaní cez skladanú gázu sme časť supernatantu naniesli na Petriho misky s médiom M resp. YPG a po kultivácii spočítali množstvo buniek a prepočítali na objem biofiltra.

Príprava biofiltra

Základným prvkom biofiltra je filtračná vrstva – nosič, na ktorom dochádza k sorpcii uhlíkovdíkovo sytého vzduchu a ich následnej biodegradácii mikroorganizmami. Laboratorným biofiltrom bola sklenená temperovaná kolóna s objemom 1000 ml naplnená aktívnym uhlím SC40 (sytná hmotnosť 430 kg m⁻³, zrnitosť 4–6 mm, vnútorný povrch 1 140 m² g⁻¹ a objem pórov 0,55 ml g⁻¹, Silcarbon, SRN). V prípade aktívneho uhlia ide o spojenie vlastnej adsorpcie škodliviny zo znečisteného vzduchu a funkcie nosiča mikroorganizmov v biofiltre. Výška náplne biofiltra bola 250 mm a vnútorný priemer 64 mm. Kontaminovaná vzdušná prechádzala cez zvlhčovač a následne cez nádobu s organickou látkou, ktorou sa vzduch kontaminoval a kontaminanty prenášal do biofiltra v smere zhora nadol. Počas biofiltrácie sa každých 7 dní do biofiltra pridávali 4 ml média MM.

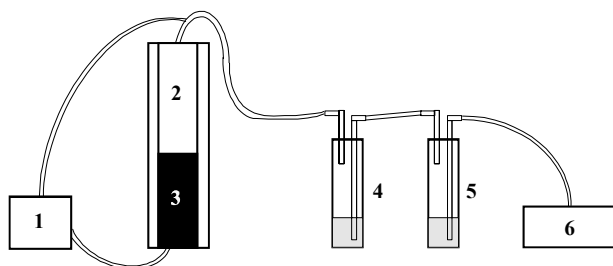
Meranie koncentrácie benzénu

Na meranie koncentrácie prchavých organických látok (VOC v ppm) sa používali plynové chromatografy Bernath Atomic (model 3005 a 3006) vybavené plameňovo-ionizačným detektorom (FID – prístroj sa kalibroval na propán). Prietok vzduchu cez jednotlivé biofiltre sa meral prietokovým plynomerom a bol nastavený na prietok vzduchu v objeme 1 m³ h⁻¹. Merala sa koncentrácia VOC na vstupe, ako aj na výstupe z biofiltra (ppm). Namerané hodnoty ppm odčítané z FID detektora po kalibrácii na propán vyjadrujeme ako mg m⁻³ po vynásobení faktorom 1,608 mg m⁻³ (hodnoty vyjadrené v g m⁻³ h⁻¹ charakterizujú špecifickú výkonnosť biofiltra).

Výsledky a diskusia

Octové baktérie rodu *Acetobacter*, ako sme prezentovali v predchádzajúcich prácach^{10,15}, patria do skupiny baktérií schopných podieľať sa na biodegradácii rôznych organických substrátov, ktoré v prostredí predstavujú hrozbu znečistenia. Zo skupiny testovaných baktérií rodu *Acetobacter* sa pre remediačné účely najlepšie osvedčili kmeňe *Acetobacter pasteurianus* 3612 a *Acetobacter pasteurianus* 3614. Sú schopné biodegradácie alifatických uhlíkovdíkovo¹⁴ ako aj niektorých aromatických derivátov, medzi ktoré zaraďujeme aj benzén¹⁰. Benzén sa ako kontaminujúca zložka výparov pri technologickej výrobe stáva nebezpečným pre prostredie a zdravie človeka¹⁷ a preto je potrebné ho kontinuálne počas výroby degradovať.

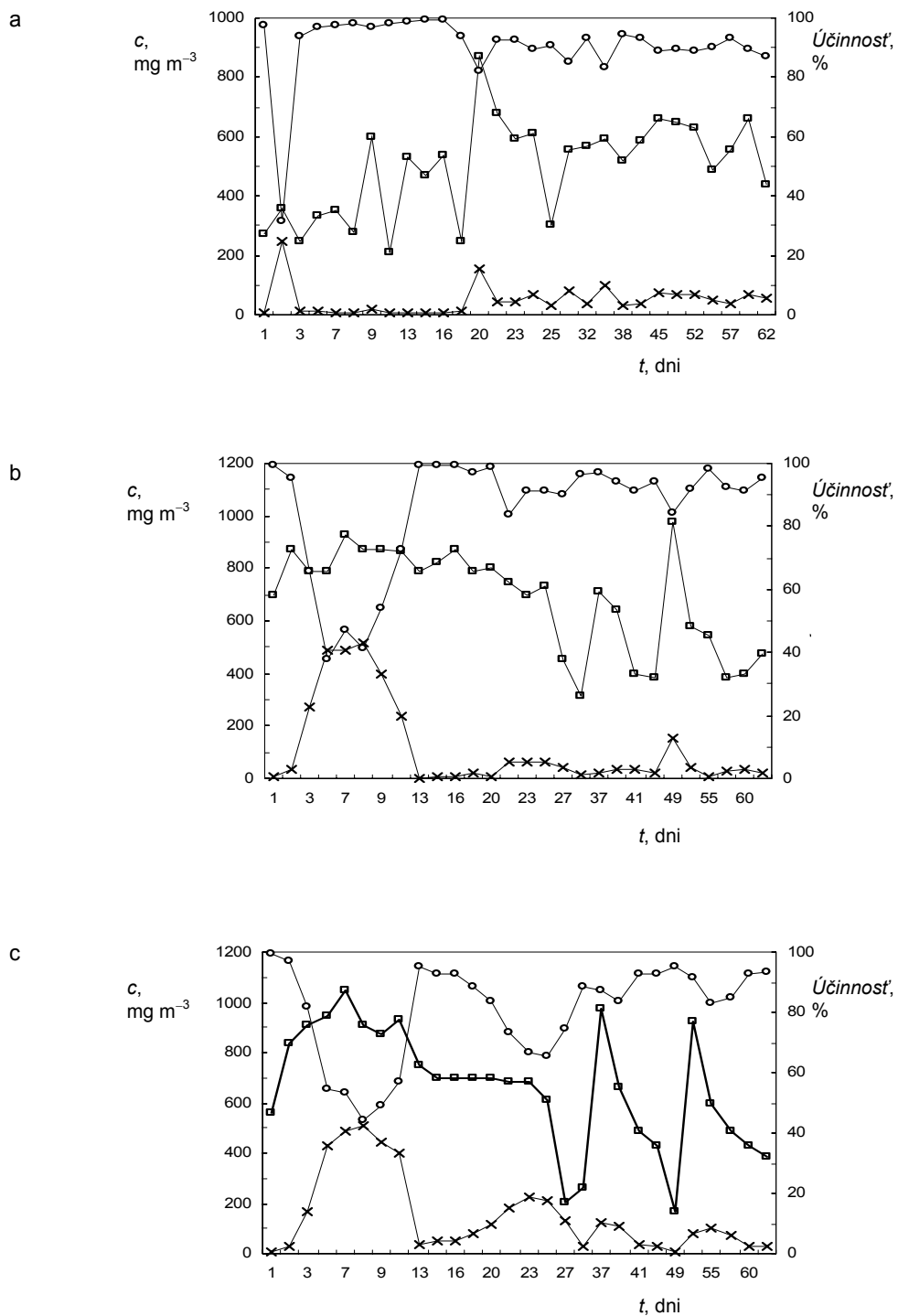
V poloprevádzkových podmienkach sme pri degradácii odpadného benzénu využili biofiltráciu cez kolónu aktívneho uhlia (obr. 1), na ktoré sme aplikovali baktérie (postup popísaný v kapitole „Príprava inokula na biofiltráciu“). Pri biodegradácii sme využili baktérie COV1 izolované z aktivovaného kalu ČOV a dva kmene baktérií *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 3614.



Obr. 1. Schematické znázornenie bioreaktora; 1 – meracie zariadenie, 2 – temperovaný bioreaktor (objem 1 liter, priemer 64 mm), 3 – sorbent (aktívne uhlie SC40), 4 – nádoba s benzénom, 5 – nádoba s vodou, 6 – zdroj vzduchu

Biodegradácia benzénu zmesnou kultúrou COV1

Pre biodegradáciu benzénu v kontinuálnom biofiltre BF1 sme využívali zmesnú kultúru buniek COV1, ktorá je za štandardných podmienok schopná odbúravať organický substrát, ako je benzén zachytený vo vodnej pare. 62 dňovú testovanú periódu biofiltra je možné rozdeliť na dve fázy. Prvou je nábehová fáza, pri ktorej dochádza k prispôbeniu sa mikroorganizmov prostrediu, druhou fázou je samotná degradácia substrátu v priebehu testovaneho cyklu biofiltra. Nábehová fáza v bioreaktore BF1 bola pomerne krátka, trvala iba 3 dni. Po dosiahnutí nábehu biofiltra po fáze adsorpcie kontaminantu na nosič bola eliminačná účinnosť biofiltrácie v rozsahu 82,0–99,5 % pri vstupnej koncentrácii benzénu v kontaminovanej vzdušnici 201–873 mg m⁻³ (obr. 2a). Počas celej pracovnej periódy biofiltra sa merala koncentrácia benzénu pred vstupom



Obr. 2. Biodegradácia benzénu na uhlíkovom laboratórnom biofiltru; a) biofilter BF1 s aktivovanými baktériami COV1, b) biofilter BF2 s bunkami *Acetobacter pasteurianus* 3612, c) biofilter BF3 s bunkami *Acetobacter pasteurianus* 3614. – □ – koncentrácia benzénu v sýtenej pare pred vstupom do biofiltra [mg m^{-3}], – × – koncentrácia benzénu v sýtenej pare po výstupe z biofiltra [mg m^{-3}], – ○ – účinnosť biofiltra [%]

do bioreaktora a po výstupe z bioreaktora (tabuľka I), pričom sa kontinuálne sledovalo pH prostredia, ktoré sa udržiavalo v rozsahu od 6,5 do 8,0 a množstvo živín v prostredí. Sledovali sme aj prežívanie baktérií v priebehu biofiltrácie a ukázalo sa, že ku koncu periódy sa počet baktérií z koncentrácie $5,4 \cdot 10^8$ buniek na ml znížil na $4,7 \cdot 10^8$ buniek na ml, čo koreluje s účinnosťou biofiltra.

Biodegradácia benzénu bunkami *Acetobacter*

Popri štandardnom biofiltri BF1 sme kontinuálne sledovali aj biofiltráciu v biofiltroch BF2 a BF3, v ktorých sme sledovali schopnosť odbúravania benzénu bunkami *Acetobacter*. Biofilter BF2 bol osadený kultúrami baktérií *A. pasteurianus* 3612. V biodegradačnej fáze pracoval s maximálnou účinnosťou v rozsahu 97,3–99,6 % v 13. až 20. deň biofiltrácie. Pred touto periódou bola účinnosť menšia z dôvodov pomalšieho nábehu a stabilizácie prostredia. V druhej časti 62 dňového cyklu prišlo k miernemu krátkodobému poklesu účinnosti biofiltra na 91,3–98,2 % (obr. 2b) a následne sa odbúravací proces vrátil na úroveň pred poklesom. Účinnosť biodegradácie bola v nábehovej časti pomerne nízka a nábehová časť trvala až 13 dní.

Biodegradácia v biofiltri BF3 sa uskutočnila baktériami *A. pasteurianus* 3614. Po 13 dňovej pomerne dlhej nábehovej fáze rýchlejšie rastúce bunky *A. pasteurianus* 3614 dokázali degradovať benzén s účinnosťou 83,7–95,3 % dosiahnutou v 13. až 20. deň biofiltrácie. V druhej časti sledovanej periódy sa účinnosť mierne znížila na 87,5–93,2 % a následne na päť dní poklesla na úroveň 65,7–74,5 % (obr. 2c). Počas celého pracovného cyklu sa v bioreaktore udržiaval prietok sýtenej pary benzénom na úrovni 398 mg m^{-3} benzénu (tab. I).

Podobne ako v prípade baktérií COV1 aj pri baktériách *A. pasteurianus* sa v priebehu biofiltrácie sledovalo ich prežívanie. Na začiatku experimentu sme pridávali $4,7 \cdot 10^8$ buniek na ml a po ukončení v bioreaktore bolo $4,2 \cdot 10^8$ buniek na ml v prípade *A. pasteurianus* 3612

a $4,4 \cdot 10^8$ buniek na ml pre *A. pasteurianus* 3614, čo znova koreluje s účinnosťou biofiltra. Vysoká schopnosť prežívania baktérií COV1 a *A. pasteurianus* v priebehu kultivácia naznačuje, že degradačné produkty benzénu nie sú pre rast sledovaných baktérií toxické. Ako je z literatúry známe, pri biodegradácii benzénu dochádza k jeho preme-ne cez *cis*-1,2-dihydroxydihydrobenzén na catechol, ktorý vstupuje do metabolických dráh väčšiny baktérií. Týmto mechanizmom dochádza k odbúravaniu benzénu v baktériách rodu *Pseudomonas*^{18,19}, ktoré tvoria podstatnú časť kultúry COV1. Vzhľadom k tomu, že baktérie rodu *Acetobacter* boli dlho na základe schopnosti metabolizovať organické látky zaradované do čeľade *Pseudomonaceae*, dá sa predpokladať, že metabolické produkty benzénu budú rovnaké.

Na základe porovnania piatich paralelných meraní v troch nezávislých bioreaktoroch BK1, BK2 a BK3 môžeme jednoznačne povedať, že pri biodegradácii benzénu v aktivovanom biofiltri sa dajú rovnako dobre využiť baktérie octového kvasenia rodu *Acetobacter* ako aj baktérie COV1, pričom účinnosť biodegradácie je porovnateľná so skoršie prezentovanými výsledkami^{20–23}. Pri porovnaní nezávislých experimentov sa odchylky účinnosti meraní pohybovali v rozsahu od 4–5 % (tab. I). Rozdiely v neprospech octových baktérií v porovnaní s COV1 sú v nábehovej rýchlosti biofiltra, kde sa octové baktérie pomalšie prispôsobujú prostrediu, ale rozdiel v účinnosti biodegradácie je pomerne malý okolo 1,3–4,2 % v prospech aktivovaných baktérií COV1. Z dvoch kmeňov *Acetobacter* je výhodnejší kmeň *A. pasteurianus* 3612, u ktorého sa neobjavuje v priebehu degradácie výrazný pokles účinnosti, čo môže mať pri dlhodobom prevádzkovanom využití významný vplyv na pokles účinnosti bioreaktora. Pri biodegradácii v prevádzkových podmienkach často dochádza k poklesu pH prostredia, čo v prípade využívania baktérií COV1 znamená podstatné zníženie účinnosti biofiltra a pravidelnú a striktnú kontrolu pH prostredia. V prípade baktérií rodu *Acetobacter* pokles pH do výrazne kyslej oblasti nemá vplyv na výraznú zmenu rastu baktérií (preferujú rast v prostredí pH 4–4,5), čo sa násled-

Tabuľka I

Porovnanie parametrov biofiltračného procesu v laboratórnych biofiltroch

Parametre	Biofilter		
	BF1	BF2	BF3
Použitá baktéria	zmes baktérií COV1	<i>A. pasteurianus</i> 3612	<i>A. pasteurianus</i> 3614
Pracovná perióda	62 dní	62 dní	62 dní
Pilot pracovnej periódy	6 deň	13 deň	13 deň
Vstupný kontaminant, mg m^{-3}	201–873	314–977	166–977
Výstupný kontaminant, mg m^{-3}	3,6–157	3,1–155	8,2–183
Retenčný čas, s	30	30	30
Účinnosť, %	82,0–99,5 ± 4,3	83,7–99,6 ± 4,1	83,7–95,3 ± 6,9 prechodne znížené na 65,7–74,5 ± 4,7

ne neprejaví na účinnosti biodegradácie benzénu a nie je potrebná dôsledná kontrola pH v priebehu biodegradácie. Pri využití v poloprevádzkových a prevádzkových podmienkach by sa dalo uvažovať aj s využitím zmesnej kultúry baktérií COV1 a *A. pasteurianus*, ktoré by sa v priebehu biodegradácie mohli vzájomne dopĺňať.

LITERATÚRA

1. McImes R. G.: Chem. Eng. Prog. 91, 36 (1995).
2. Siegel J. H.: Hydrocarbon Process. 74, 77 (1995).
3. Lith Ch., Leson G., Michelsen R.: J. Air & Waste Manage. Assoc. 47, 37 (1997).
4. Auria R., Ayacaguer A., Devanny J. S.: J. Air & Waste Manage. Assoc. 48, 65 (1998).
5. Bohn H.: Chem. Eng. Progress 88, 34 (1992).
6. Kiared K., Fundenberger B., Bryeyinski R., Viel G., Heity.: Ind. Eng. Chem. Res. 36, 4719 (1997).
7. Harayama S., Rekik M., Wubbolts M., Rose K., Lep-pik R. A., Temmis K. N.: J. Bacteriol. 171, 5048 (1997).
8. Panke S., Sánchez-Romerro J. M., Delorenzo V.: Appl. Environ. Microbiol. 64, 748 (1998).
9. Harayama S., Rakik M., Wubbolts M., Rose K., Lep-pik R. A., Temmis K. N.: J. Bacteriol. 171, 5048 (1989).
10. Grones J., Stuchlík S., Siekel P., Beňo J., Eszényiová A.: Petroleum and Coal. 39, 26 (1997).
11. Axcell B. C., Geary P. J.: Biochem J. 146, 173 (1975).
12. Nakai T., Tonouchi N., Konishi T., Kojima Y., Tsuchida T., Yoshinaga F., Sakai F., Hayashi T.: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 14 (1999).
13. Griffin A. M., Morris V. J., Gasson M. J.: J. Sequen. Mapp. 6, 275 (1996).
14. Griffin A. M., Morris V. J., Gasson M. J.: Int. J. Biol. Macromol. 16, 287 (1994).
15. Grones J., Bilská V., Eszenyiova A.: Petroleum and Coal 41, 105 (1999).
16. Kretová M., Grones J.: Chem. Listy 99, 144 (2005).
17. Lan Q., Zhang L., Li G., Vermeulen R., Weinberg R. S., Dosemeci M., Rappaport S. M., Shen M., Alter B. P., Wu Y., Kopp W., Waidyanatha S., Rabkin C., Guo W., Chanock S., Hayes R. B., Linet M., Kim S., Yin S., Rothman N., Smith M. T.: Science 306, 1774 (2004).
18. Gibson D. T., Koch J. R., Kallio R. E.: Biochemistry 7, 3795 (1968).
19. Gibson D. T., Cardini G. E., Maseles F. C., Kallio R. E.: Biochemistry 9, 1631 (1970).
20. Matteau Y., Ramsay B.: Biodegradation 8, 135 (1997).
21. Frazer L.: Environ. Health Perspect 108, 178 (2000).
22. Kim J. O., Lee W. B.: Environ. Technol. 23, 438 (2002).
23. Li G. W., Hu H. Y., Hao J. M., Zhang H. Q.: Water Sci. Technol. 46, 51 (2002).

V. Bilská^a, S. Feriancová^a, and J. Grones^b (^a Slovnaft Research Institute and Hydrocarbon Gases, Vlčie hrdlo, Bratislava, ^b Department of Molecular Biology, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic): **Biodegradation of Benzene by Acetic Acid Bacteria in Biofilter**

The aim of this study was to investigate the biodegradation of volatile organic compounds by acetic acid bacteria characterized by their strong activity in oxidation of alcohol and a wide range of sugars. Possible utilization of *Acetobacter pasteurianus* 3612 and *A. pasteurianus* 3614 as a source of microorganisms in biofiltration processes was evaluated in the treatment of air contaminated with benzene. Process parameters, e.g. inlet and outlet concentrations of contaminant, elimination efficiency and loading rate in laboratory biofilters were evaluated for 62 days of biofilter operation. Biofiltration experiments by adding *Acetobacter* cells into the biofiltration bed have revealed benzene degradation in biofilters with the efficiency up to 83.7–99.6 %. The obtained data are comparable with the biodegradation efficiency of conventionally used bacteria from activated sludge waste treatment. Increasing concentration of the tested contaminant in air had no negative effect on biofilter operation.