

Teresa FARBISZEWSKA*, Jadwiga FARBISZEWSKA-BAJER**, Teresa SUDOL*

BIODEGRADACJA SUBSTANCJI TŁUSZCZOWYCH Z GRUNTÓW – IZOLOWANIE MIKROORGANIZMÓW BIODEGRADUJĄCYCH SUBSTANCJE TŁUSZCZOWE

Przedstawiono proces izolacji wysokoaktywnej mikroflory biodegradującej substancje tłuszczowe oraz skład pożywki zapewniającej najkorzystniejsze warunki hodowli. Stwierdzono, że mikroflora wzrastająca na pożywce z olejem, stanowiącym główne zanieczyszczenie badanych odpadów, ma dużą aktywność życiową i może być stosowana do detoksykacji tych odpadów.

1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach prowadzone są badania nad możliwością degradacji odpadów przemysłowych przy współdziale mikroorganizmów (Alexander M. 1981; Łabużek S. 1991). Dotyczą one przede wszystkim odpadów przemysłu farmaceutycznego, chemicznego, petrochemicznego i spożywczego (Gibson D.T. 1984; Meinck F. i in. 1975, Cerniglia C.E. 1984). Degradacja tych odpadów polega na wykorzystaniu systemu enzymatycznego wybranych mikroorganizmów, zdolnego do rozkładu wielkocząsteczkowych związków organicznych w substancje proste, nieszkodliwe dla środowiska. Mikroorganizmy wykorzystywane do biodegradacji organicznych substancji odpadowych uzyskują najczęściej zdolności degradacyjne dopiero po ich wstępnej adaptacji (Haung Y.T. i in. 1986).

Dużym problemem dla środowiska naturalnego są odpady przemysłu spożywczego, zawierające znaczne ilości tłuszczów i produktów ich rozkładu. Występuje on głównie w zakładach tłuszczowych, gdzie składowiska odpadów zanieczyszczają atmosferę i są potencjalnym źródłem skażenia wód gruntowych.

Prowadzone przez nas w ostatnich latach badania nad biodegradacją węglowodorów ropopochodnych ze skażonych gruntów zasugerowały nam zajęcie się biodegradacją związków tłuszczowych. Biorąc pod uwagę skalę tego problemu, wydaje się celowe opracowanie prowadzenia detoksykacji tłuszczów *in situ*, przy współdziale mikroorganizmów, gdyż byłaby to metoda najbardziej ekonomiczna,

*Uniwersytet Opolski, Instytut Chemii, 45-291 Opole, ul. Oleska 48.

**Uniwersytet Opolski, Instytut Techniki, 45-365 Opole, ul. Dmowskiego 7-9.

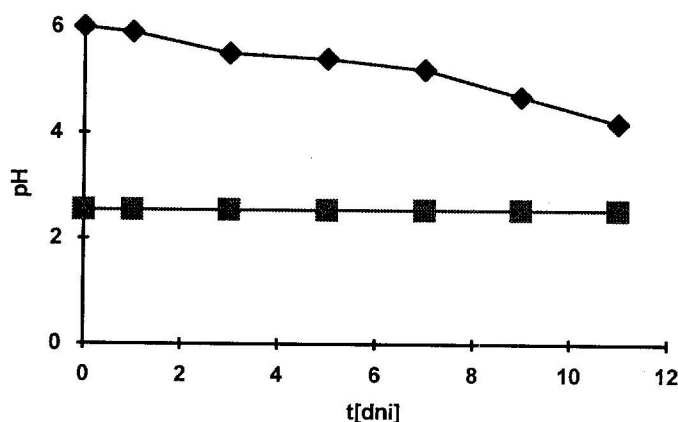
zasadniczymi bowiem zaletami metod biologicznych prowadzonych *in situ* jest stosunkowo duża efektywność oczyszczania przy niskich nakładach inwestycyjnych. Z uwagi na specyfikę odpadów, wykonanie mikrobiologicznej detoksykacji wymaga każdorazowo wstępnych badań laboratoryjnych, połączonych z wyizolowaniem i uaktywnianiem mikroflory zawartej w odpadach.

W pracy tej przedstawiono proces wyizolowania mikroflory pochodzącej z odpadowych dołów osadowych Nadodrzańskich Zakładów Tłuszczowych w Brzegu.

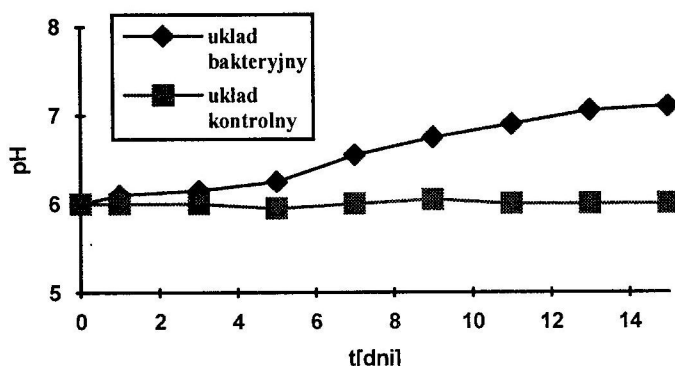
2. WYIZOLOWANIE AUTOCHTONICZNEJ MIKROFLORY Z GRUNTU

Wstępne hodowle mikroorganizmów prowadzono w ekstrakcie odpadowym, stanowiącym pożywkę, zmieszanym z fazą stałą odpadów w stosunku s:c = 1:10. Ponieważ pH ekstraktu odpadowego wynosiło 2,54, a zgodnie z danymi literaturowymi (Murray K. 1989) bakterie degradujące substancje tłuszczowe w tak kwaśnym środowisku tracą aktywność życiową, część ekstraktu zobojętniono do pH = 6,0. Uzyskano więc dwie pożywki, w których prowadzono wstępną izolację. Hodowle trwały przez 11 dni, w temperaturze 37 °C, w układach napowietrzanych. Co drugi dzień kontrolowano pH układów. Wyniki pomiarów przedstawiono na rys. 1.

Z przebiegu krzywych wynika, że w układach kwaśnych o pH = 2,54 nie obserwowano zmiany kwasowości pożywki, natomiast w układach o pH = 6,0 obserwowano systematyczny wzrost kwasowości, na który złożyło się najprawdopodobniej oddziaływanie kwaśnych odpadów połączone ze wzrostem mikroorganizmów przekształcających tłuszcze w kwasy tłuszczowe i niższe kwasy karboksylowe. Hipotezę tę potwierdziły badania mikroskopowe, wykonane w ostatnim dniu trwania hodowli. Wykazały one pojawienie się dużej ilości mikroflory w układach



Rys. 1. Zmiana pH pożywek w pierwszej fazie izolacji mikroflory



Rys. 2. Zmiana pH pożywki w układzie bakteryjnym i kontrolnym prowadzonym w temperaturze 37 °C

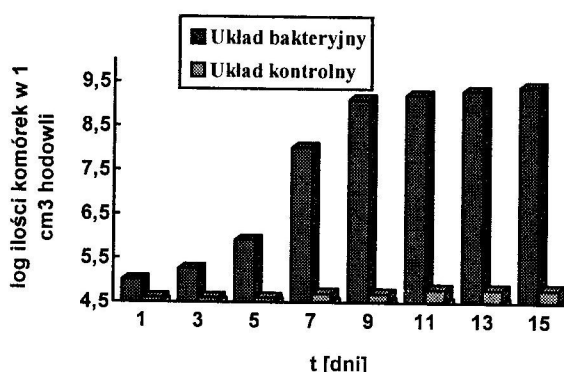
o wyjściowym pH = 6,0, natomiast ilość mikroflory w układach o pH = 2,54 była znikoma.

Dalsze hodowle wyizolowanych wstępnie bakterii prowadzono w warunkach sterylnych, w pożywce o składzie:

NH_4Cl	– 0,1%	
K_2HPO_4	– 0,1%	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,05%	
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	– 0,1%	pH=6,0
ekstrakt drożdżowy	– 0,1%	

Pożywkę pierwotnie zaszczipiono hodowlą wstępną. W kolejnych 5 przesiewach stosowano do zaszczepu hodowle znajdujące się w fazie logarymicznego wzrostu. Hodowle każdorazowo prowadzono przez 15 dni, w temperaturze 37 °C, w układach napowietrzanych. Etap wyizolowania mikroflory zakończono przeprowadzeniem hodowli w opisany powyżej sposób wobec hodowli sterylnej, do której nie wprowadzono mikroorganizmów, dodając natomiast tymol, jako substancję bakteriostatyczną. W obydwu układach – sterylnym i niesterylnym – co dwa dni kontrolowano pH i określano ilość mikroorganizmów w 1 cm³ hodowli. Wyniki zobrazowano na rys. 2 i 3.

W układzie kontrolnym nie stwierdzono zmiany pH (rys. 2), czego potwierdzeniem było pojawienie się jedynie minimalnej ilości komórek bakteryjnych w hodowli sterylnej (rys. 3). W układzie bakteryjnym obserwowano wyraźny wzrost ilości mikroorganizmów do 9 dnia trwania hodowli (rys. 3), któremu towarzyszył wzrost pH hodowli (rys. 2). Kwasowość hodowli malała najintensywniej między 4 a 10 dniem jej trwania. Po 15 dniach trwania hodowli mikroflorę bakteryjną poddano wstępnej identyfikacji taksonomicznej, która wykazała istnienie: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Nitrosomanas* sp. i *Pseudomonas denitrificaus*. Równocześnie w hodowli nie stwierdzono obecności bakterii chorobotwórczych (Atlas R.M. 1986).



Rys. 3. Ilość mikroorganizmów w 1 cm³ pożywki w kolejnych dniach trwania hodowli prowadzonej w temperaturze 37 °C

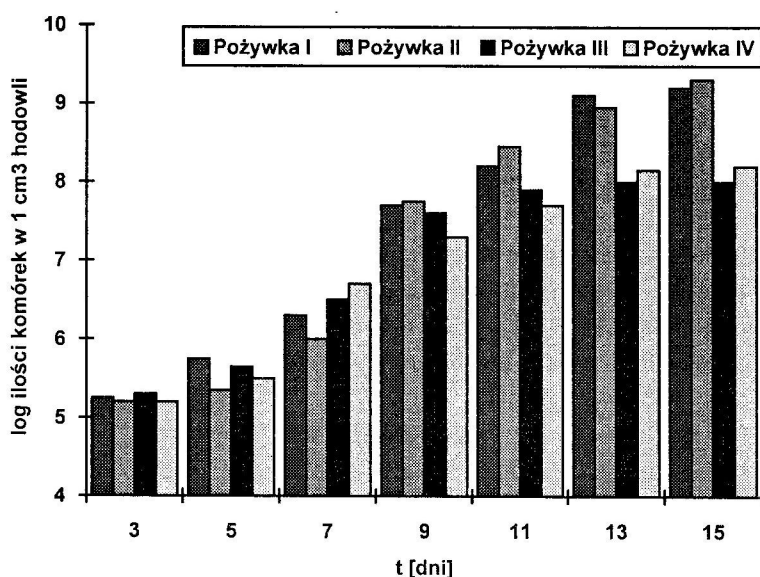
3. DOBÓR SKŁADU POŻYWKI

Po uzyskaniu aktywnej mikroflory autochtonicznej postanowiono przetestować kilka pożywek zawierających węgiel w postaci octanu sodu, ekstraktu drożdżowego i oleju roślinnego. Do badań wybrano pożywki o składzie:

Pożywka I		Pożywka II	
NH ₄ Cl	– 0,1%	NH ₄ Cl	– 0,1%
K ₂ HPO ₄	– 0,1%	K ₂ HPO ₄	– 0,1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,05%	MgSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,05%
CH ₃ COONa · 2H ₂ O	– 0,1%	CH ₃ COONa · 2H ₂ O	– 0,1%
ekstrakt drożdżowy	– 0,1%	olej brzeski	– 0,1%
Pożywka III		Pożywka IV	
NH ₄ Cl	– 0,1%	NH ₄ Cl	– 0,1%
K ₂ HPO ₄	– 0,1%	K ₂ HPO ₄	– 0,1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,05%	MgSO ₄ · 7H ₂ O	– 0,05%
olej brzeski	– 0,2%	CH ₃ COONa · 2H ₂ O	– 0,2%

Testowane pożywki miały jednakową kwasowość pH = 6,0. Do zaszczepiania używano 10-dniowej hodowli, wcześniej wyizolowanej mikroflory, zawierającej 10⁹ komórek w 1 cm³. Hodowle prowadzono w temperaturze 25 °C, w układach napowietrzanych, przez 15 dni. Co 2 dni prowadzono kontrolę pH hodowli i ilość komórek w 1 cm³. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 4 i 5.

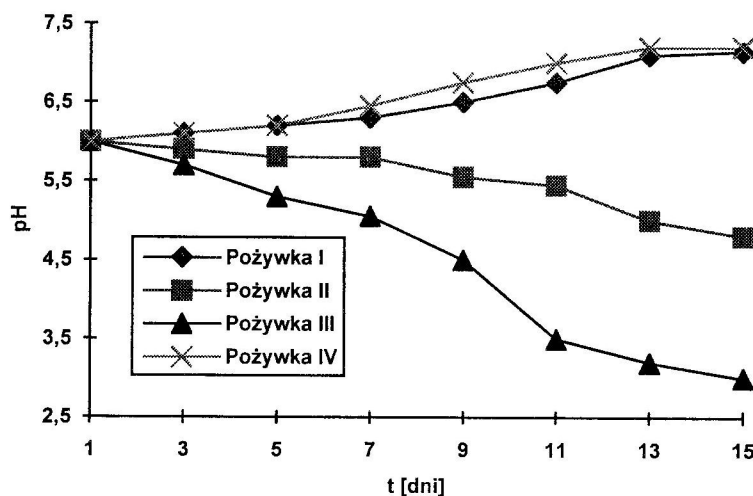
Z rys. 4 wynika, że najintensywniej bakterie wzrastały na pożywce I – intensywny wzrost zaczynał się już w 5 dniu trwania hodowli. Pożywka II była również atrakcyjna dla testowanej mikroflory. Intensywny wzrost rozpoczął się dopiero między 7 a 9 dniem trwania hodowli, ale potem nie odbiegał od wzrostu na pożywce I. Przyrost mikroorganizmów w pożywce III i IV był mniej intensywny. Rysu-



Rys. 4. Ilość komórek bakterii w kolejnych dniach trwania hodowli w zależności od składu pożywki

nek 5, obrazujący zmiany pH pożywek w omawianym doświadczeniu, stanowi wyjaśnienie rysunku 4. Mikroorganizmy w pożywce IV jeszcze w 7 dniu rości intensywniej niż w pożywce II, co świadczy o tym, że sam olej jest dla nich „lepszym” źródłem węgla niż olej z octanem.

Po przeanalizowaniu wzrostu mikroflory w poszczególnych pożywkach postanowiono do dalszych badań wybrać pożywkę II z octanem sodu i olejem brze-



Rys. 5. Zmiana pH hodowli wyizolowanej mikroflory w zależności od składu pożywki

skim, gdyż nie obserwowano w niej znacznych zmian pH, a wzrost mikroflory był wyraźny.

4. PODSUMOWANIE

W wyniku przeprowadzanych badań stwierdzono, że mikroflora wzrastająca na pożywce z olejem brzeskim, stanowiącym główne zanieczyszczenie badanych odpadów, posiada wystarczająco wysoką aktywność życiową, aby mogła być, po procesie jej adaptacji, stosowana do ich detoksykacji.

LITERATURA

- ALEXANDER M. (1981), *Science*, 211, 132–138.
- ATLAS R.M., (1986), *Basic and practical microbiology*, New York, Macmillan Publishing Company.
- CERNIGLIA C.E. (1984), *Petroleum Microbiology*, Atlas R.M. (ed.), New York, 99–128.
- GIBSON D.T., SUBRAMANIAN V. (1984), *Microbiology degradation of organic compounds*, Gibson D.T. (ed.), New York, Dekker Inc., 181–252.
- HAUNG Y.T., HORSFALL III F.L., WONG L.M., COKER D.R. (1986), *Inter. J. Environ. Studies*, 28, 41.
- ŁABUŹEK S. (1991), *Biotechnologia*, 3–4, (13–14), 90–101.
- MEINCK F., STOFF M., KOHSCHUTTER H. (1975), *Ścieki przemysłowe*, Warszawa, Arkady.
- MURRAY K. (1989), *Aquaculture engineering technologies for future*, Inst. Chem. Eng. V. K., Symp. Ser. No. 111.

Farbiszewska T., Farbiszewska-Bajer J., Sudoł T., (1995), Biodegradation of aliphatic compounds present in soils. Isolation of microorganisms degrading aliphatic compounds. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 29, 151–156 (Polish text)

A process of isolation of highly active microfloras which degrade aliphatic compounds containing, as the main component, vegetable fat was presented. The feed for the best breeding of the microorganisms was selected. The microflora was bred in the medium containing vegetable fat which has a highly biotic activity. The applicability of the investigated microflora to the biodegradation of wastes containing vegetable fats was determined.