

Teresa SUDOŁ<sup>\*</sup>, Teresa FARBISZEWSKA<sup>\*</sup>,  
Jadwiga FARBISZEWSKA-BAJER<sup>\*\*</sup>

## **MECHANIZM PRZEMIAN CHEMICZNYCH W PROCESIE BIODEGRADACJI SUBSTANCJI TŁUSZCZOWYCH**

Przedstawiono analizę mechanizmu biodegradacji tłuszczów przez mikroflorę autochtoniczną. W czasie 30-dniowego procesu osiągnięto 62% zmniejszenie zawartości substancji tłuszczowych. Na podstawie analizy NMR, IR i GC stwierdzono zmniejszenie ilości atomów węgla zawartych w związkach alifatycznych na rzecz związków olefinowych oraz powstanie znacznej ilości niższych kwasów karboksylowych, których obecność zwiększa kwasowość (pH = 3,5) i prowadzi do hamowania procesu.

### **WPROWADZENIE**

Równoległe z rozwojem wielu gałęzi przemysłu wzrosła ilość substancji ksenobiotycznych, szkodliwych dla środowiska. Do najbardziej szkodliwych ksenobiotyków należą substancje organiczne powstające w procesach przeróbki chemicznej węgla, petrochemii, w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym, barwników, nawozów sztucznych i spożywczym (Cerniglia 1984, Gibson et al. 1984, Łabużek 1991).

W ostatnich latach prowadzone są badania nad możliwością usuwania tych związków ze środowiska przy współudziale drobnoustrojów wykorzystujących substancje, które mają być degradowane jako źródło energii i węgla. W większości przypadków nie powodują one jednak degradacji ksenobiotyków. Drobnoustroje o pożądanym zdolnościach, degradujące substancje ksenobiotyczne, można uzyskać dopiero po ich wstępnej adaptacji (Farbiszewska-Bajer et al. 1995).

Tłuszcze i kwasy tłuszczowe należą do materiałów odpadowych w przemyśle spożywcym. Stanowią one duże zagrożenie dla środowiska, gdyż przenikają do wód gruntowych, a nawet infiltrują dalej, do wód warstw wodonośnych (Murray 1989).

Zajmując się utylizacją tłuszczów i kwasów tłuszczowych zastosowano metodę mikrobiologicznej degradacji. Po stwierdzeniu możliwości prowadzenia procesu (Farbiszewska et al. 1995) postanowiono ustalić jego wstępny mechanizm. W tym

---

<sup>\*</sup> Uniwersytet Opolski, Instytut Chemii, 45-291 Opole, ul. Oleska 48.

<sup>\*\*</sup> Uniwersytet Opolski, Katedra Inżynierii Procesowej, 45-365 Opole, ul. Dmowskiego 7–9.

celu z biodegradowanego gruntu wyizolowano i zagęszczono substancje tłuszczowe przed degradacją, w trakcie jej trwania i po zakończeniu procesu. Każdorazowo przeprowadzono kompleksową analizę jakościową i ilościową tych próbek z zastosowaniem metody chromatografii gazowej, spektrometrii IR oraz <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR. Wyniki analiz ilościowych i jakościowych badanych próbek posłużyły do zaproponowania prawdopodobnego mechanizmu przemian chemicznych w procesie biodegradacji zanieczyszczeń tłuszczowych.

### APARATURA I WARUNKI POMIARÓW

Do analizy zanieczyszczeń gruntu wykorzystano następujące metody instrumentalne:

- chromatografia gazowa (GC),
- spektroskopia w podczerwieni (IR),
- spektroskopia magnetyczna rezonansu jądrowego (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR).

Do analizy metodą chromatografii gazowej zastosowano aparat firmy Hewlett-Packard model 5890/II, wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny. Rozdział chromatograficzny prowadzono w kwarcowej kolumnie kapilarnej ze związaną fazą stacjonarną HP-FFAP. Próbkę dozowano metodą *on column*.

W badaniach spektrometrii <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR posługiwano się przyrządem firmy Tesla, model BS 567 A produkcji czechosłowackiej, pracującym przy częstotliwości 100 MHz dla <sup>1</sup>H i 25.142 MHz dla <sup>13</sup>C. Jako wzorzec do określenia przesunięć chemicznych zastosowano tetrametylosilan (TMS).

Do analizy metodą spektrometrii IR wykorzystano aparat firmy Analytical (Philips) model PU 9800 FT-IR Spectrometer. Próbkę w postaci filmu naniesionego na kryształ chlorku sodu badano w zakresie liczb falowych 400–750 cm<sup>-1</sup>.

### METODYKA BADAŃ

Analizę próbek gruntu przeprowadzono przed, w trakcie trwania i po procesie biodegradacji.

Tabela 1. Zmiany pH i zawartości tłuszczów w glebie w czasie jej biodegradacji

Lp.	Czas trwania biodegradacji [dni]	pH	Zawartość tłuszczów w glebie [g/kg gleby]	Efekt biodegradacji [%]
1	0	6,58	366,19	0
2	10	3,50	218,22	40,4
3	20	3,48	140,80	61,6

4	30	3,30	137,46	62,5
---	----	------	--------	------

Procesowi biodegradacji poddano zaolejoną ziemię bielącą z osadnika odpadów Nadodrzańskich Zakładów Tłuszczowych w Brzegu. Z ziemi tej wyizolowano autochtoniczną mikroflorę i zaadaptowano ją do dużych stężeń oleju roślinnego (maks. 10%). Po uzyskaniu aktywnej mikroflory autochtonicznej, użyto jej do badań. W hodowli stwierdzono obecność między innymi szczepów bakterii: *Aerobacter aerogenus*, *Bacillus subtilis*. Proces biodegradacji prowadzono w temperaturze pokojowej, w układach napowietrznych w kolbach o poj. 200 cm<sup>3</sup>, do których wprowadzono: 100 g pożywki, 30 g zaolejonej ziemi bielącej, 5 cm<sup>3</sup> aktywnej hodowli bakteryjnej o zawartości 10<sup>9</sup> komórek w cm<sup>3</sup>.

Proces prowadzono w układach potrójnych w czasie 30 dni. Co 10 dni z próbek gruntu ekstrahowano tłuszcze chloroformem w aparatach Soxhleta i ekstrakty analizowano chromatograficznie i spektroskopowo oraz kontrolowano pH układów.

## WYNIKI POMIARÓW

Zmianę pH i zawartość zanieczyszczeń tłuszczowych w gruncie przedstawiono w tabeli 1. Z danych tych wynika, że w trakcie procesu występuje silne zakwaszenie układu. Wyjściowe pH wynosiło 6,58 i w pierwszych 10 dniach procesu zmalało do 3,5, co świadczy o rozwoju mikroflory w tym układzie i jej biodegradacyjnym działaniu. Dalszy spadek pH hamuje proces rozwoju mikroorganizmów, gdyż giną one przy pH poniżej 3,5. Kolejne analizy wyekstrahowanych tłuszczów wykazały, że po 10 dniach trwania procesu biodegradacji, ilość zanieczyszczeń tłuszczowych spadła o ponad 40%, a po 20 dniach tylko o kolejne 20%. W następnych dniach praktycznie biodegradacja ustała i dlatego proces przerwano.

Uzyskane ekstrakty tłuszczowe analizowano chromatograficznie i metodami spektroskopowymi.

Drgania znalezione w widmach IR wskazują, że zasadniczymi składnikami badanych próbek są związki zawierające ugrupowania alifatyczne. Pojawia się również niewielka ilość związków aromatycznych i związków z grupą karbonylową. Charakterystyczne pasma absorpcyjne występujące w omawianych widmach i przyporządkowane im najbardziej prawdopodobne elementy strukturalne analizowanych związków ujęto w tabeli 2.

Widma <sup>1</sup>H NMR badanych próbek wykazują obecność protonów związanych z atomami węgla związków parafinowych, olefinowych i aromatycznych. Dystrybucję atomów wodoru zamieszczono w tabeli III. Z dystrybucji tej wynika, że w mieszaninach dominują protony związków alifatycznych, a protony związków aromatycznych występują w znikomych ilościach. Widocznym zmianom w trakcie biodegradacji ulega ilość protonów grup metylowych związków alifatycznych. Zawartość ich rośnie w pierwszych 10 dniach trwania procesu, a następnie ulega stabilizacji, czemu towarzyszy hamowanie procesu. Równocześnie zmniejszeniu ulega

zawartość grup metylenowych. Widoczna jest również zmiana w zawartości protonów olefinowych.

Tabela 2. Pasma absorpcyjne w widmach IR tłuszczów ekstrahowanych z zaolejonej ziemi bielącej

Liczba falowa [cm <sup>-1</sup> ]	Rodzaj drgania	Elementy strukturalne
3005	rozc. C–H	–CH=CH– CR <sub>1</sub> R <sub>2</sub> =CHR <sub>3</sub> układ aromatyczny
2925, 2854	rozc. C–H (sym. i asym.)	Ar–CH <sub>3</sub> –CH <sub>2</sub> – w cykloalkanach
1741, 1711	rozc. C=O	aldehydy, kwasy karboksylowe, estry
1465	def. asym. C–H nożycowe C–H	–CH <sub>3</sub> , –CH <sub>2</sub> – –CH <sub>2</sub> –O– (estry)
1414	def. C–H	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> C=C–H
1378	def. sym. C–H	CH <sub>3</sub>
1243	def. C–O	estry
966	rozc. C–H	C=C–H
722	def. C–H	zw. aromatyczne R <sub>1</sub> CH=CHR <sub>2</sub> (cis) (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> n > 4

Tabela 3. Dystrybucja atomów wodoru (%) w badanych próbkach, wyznaczona metodą <sup>1</sup>H NMR

Zakres przesunięć chemicznych δ (ppm)	Udział procentowy			
	wyjściowa	10 dzień	20 dzień	30 dzień
H <sub>γ</sub> (–CH <sub>3</sub> ) < 1,1 ppm	9,61	14,80	14,72	13,41
H <sub>β</sub> (–CH <sub>2</sub> , –CH–) 1,1–1,8 ppm	68,49	62,06	61,19	64,98
H <sub>α</sub> (Ar–CH <sub>3</sub> ) 1,8–3,2 ppm	14,32	15,14	15,49	14,11
H <sub>ol</sub> (C=CH) 4,3–5,8 ppm	5,28	6,23	7,91	5,23
H <sub>ar</sub> (Ar–H) > 6,7 ppm	2,30	1,77	0,69	2,27

W tabeli 4 przedstawiono dystrybucję różnych atomów węgla (na podstawie widm <sup>13</sup>C NMR) w ekstraktach wraz z ich zakresami przesunięć chemicznych.

Z przedstawionych danych wynika, że w mieszaninach tych przeważają związki alifatyczne. Największe zmiany w zawartości atomów węgla w trakcie trwania procesu można zaobserwować w przypadku węgli alifatycznych i podstawionych (olefinowe atomy węgla). Pozostałe typy atomów węgla zmieniają się stopniowo w trakcie trwania procesu.

Tabela 4. Względne intensywności różnych atomów węgla określonych za pomocą widm  $^{13}\text{C}$  NMR

Zakres przesunięć chemicznych ( $\delta$ ) ppm	Względne intensywności [%]			
	wyjściowa	10 dzień	20 dzień	30 dzień
C alifat. (0–50 ppm)	69,91	21,08	29,72	28,52
C podstaw. (50–110 ppm)	20,06	34,66	6,15	6,34
C aromat. (110–145 ppm)	8,41	3,84	2,20	2,22
C karboksyl. (165–185 ppm)	1,82	–	0,37	0,39

Po przeanalizowaniu chromatogramów badanych próbek stwierdzono, że już po 10 dniach trwania procesu w ekstraktach uzyskanych z biodegradowanego gruntu nie obserwuje się obecności wyższych kwasów tłuszczowych.

Końcowe pH układów ok. 3,5 świadczy o obecności w nich niższych, stosunkowo mocnych kwasów karboksylowych: mrówkowego i octowego, powstających w wyniku biodegradacji tłuszczów.

Widma  $^{13}\text{C}$  NMR wskazują na zmniejszenie ilości atomów węgla w związkach alifatycznych na rzecz wzrostu ilości węgli olefinowych, co może sugerować oderwanie się końcowych grup metylowych (w postaci  $\text{CH}_3-$ ,  $\text{CH}_3-\text{O}$  lub  $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}$ ) z utworzeniem wiązań nienasyconych, a także przemieszczanie się tych grup wzdłuż łańcucha, wskutek czego powstają związki rozgałęzione.

Grupy metoksy lub etoksy są źródłem tworzącego się kwasu mrówkowego i octowego. Powstanie dużej ilości niższych kwasów karboksylowych hamuje proces ich dalszej biodegradacji do  $\text{CO}_2$ . Sugeruje to, że w dalszych badaniach należy dodawać do próbek węglanu wapnia, którego obecność, wskutek zwiększania się pH, ułatwi biodegradację.

## LITERATURA

- CERNIGLIA C.E., 1984, *Petroleum microbiology*, Atlas R. M. (ed), New York, 99–128.  
 FARBISZEWSKA T., FARBISZEWSKA-BAJER J., SUDOŁ T., 1995, *Biodegradacja substancji tłuszczowych z gruntów – izolowanie mikroorganizmów biodegradujących substancje tłuszczowe*, Fizykochemiczne problemy mineralurgii, 29, 151–156.

- FARBISZEWSKA-BAJER J., FARBISZEWSKA T., SUDOL T., 1995, *Biodegradacja substancji tłuszczowych z gruntów – adaptacja wyizolowanej mikroflory*, *Fizykochemiczne problemy mineralurgii*, 29, 145–149.
- GIBSON D.T., SUBRAMANIAN V., 1984, *Microbiology degradation of organic compounds*, Gibson D.T. (ed.), New York, Dekker Inc., 181–252.
- ŁABUŹEK S., 1991, *Biotechnologia*, 3–4, (13–14), 90–101.
- MURRAY K., 1989, *Aquaculture engineering technologies for future*, Inst. Chem. Eng. U.K., Symp. Ser. No. 111, 329.

**Sudo<sup>3</sup> T., Farbiszewska T., Farbiszewska-Bajer J.**, Mechanism of chemical changes on the process of biodegradation of fats., *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 31, 241–246 (in Polish)

The analysis of biodegradation mechanisms of fats by using autochthonous bacteria strains has been presented. It was found that in 30 days 62% of aliphatic compounds were removed. There was a noticeable decrease of the content of the aliphatic coal components in favour of olefin component and a great amount of carboxylic acid was formed. This caused the diminishing of pH to 3.5 and the investigated process was inhibited.