

### MIKROBIOLOGICZNA DEGRADACJA BIODIESLA W WARUNKACH TLENOWYCH

Wyjściowe badania miały na celu wytypowanie mikroorganizmów zdolnych do efektywnej degradacji biodiesla oraz jego mieszanek z olejem napędowym. W oparciu o wstępną selekcję do badań wytypowano 4 szczepy mikroorganizmów, które charakteryzowały się wysoką wydajnością degradacji biopaliw B100, B10, B20 i B30. Były to drożdże *Candida methanosorbosa* DB13, bakterie *Bacillus subtilis* P31, *Gordonia alkanivorans* S7 i *Achromobacter xylosoxidans* G21.

Kolejno, w celu weryfikacji czynników, które wpływają na mikrobiologiczny rozkład biodiesla lub mieszanin diesel/biodiesel określono efektywność degradacji biopaliw w warunkach tlenowych, w zależności od składu chemicznego i stężenia produktu (biopaliw) w środowisku. Stwierdzono, że drożdże *C. methanosorbosa* DB13 z najwyższą wydajnością degradują biodiesel B100 zarówno w środowisku płynnym (np.: ubytek zanieczyszczenia dla stężenia 8% v/v – 97%) oraz glebie (ubytek zanieczyszczenia dla stężenia 5% v/w - 98,33%). Natomiast mieszanki (B10, B20, B30) były usuwane ze środowiska przy udziale stosowanych drożdży i bakterii w sposób różnicowany. Drożdże *C. methanosorbosa* DB13, w środowisku wodnym, degradowały biopaliwa (B10, B20, B30) ze zbliżoną wydajnością co ON. Natomiast podczas biodegradacji (B10, B20, B30) z udziałem bakterii zaobserwowano obniżenie skuteczności rozkładu paliwa w odniesieniu do oleju napędowego, niezależnie od stężenia (5, 8 12 % v/v). Rozkład biopaliw (B10, B20, B30) był mniejszy nawet o 64% od ON. Uzupełniająco oceniono też pH, w środowisku. Intensywna hydroliza biodiesla B100 z udziałem wytypowanych szczepów doprowadziła do zakwaszenia środowiska. Zmian takich nie zaobserwowano podczas biodegradacji ON, B10, B20 i B30.

Poza oceną efektywności procesu (analiza GC), jednocześnie prowadzono pomiary, pozwalające ocenić stan fizjologiczny stosowanych szczepów. W oparciu o pomiar szybkości pobierania tlenu w środowisku wodnym wykazano, że aktywności metaboliczne wykorzystywanych szczepów były wyższe podczas biodegradacji B100 niż ON. Drożdże *C. methanosorbosa* DB13 wykazywały w tym względzie najwyższą szybkość pobierania tlenu równą (dla stężenia równego 5% v/v B100 w 2 dniu  $AO = 50,1 \text{ mg O}_2/\text{min} \cdot \text{l}$ ). Biosynteza oraz aktywność enzymów niezbędnych do biodegradacji zanieczyszczenia zależna jest od składu chemicznego paliwa i jego

## Streszczenie

---

stężenia, dlatego przeprowadzono charakterystykę aktywności esteraz, jako pierwszych enzymów biorących udział w degradacji FAME oraz określono ilości głównych produktów pośrednich, jakie trafiają do środowiska w wyniku rozcięcia łańcuchów estrowych. W badaniach, najwyższe aktywności esteraz odnotowano podczas biodegradacji, biodiesla B100 oraz biopaliw B10, B20, B30 u szczepu *C. methanosorbosa DB1* (w glebie nawet do 58,2  $\mu\text{mol pNP/g s.m.g} \cdot \text{min}$ ). Równocześnie zauważono, że intensywny metabolizm FAME spowodował uwolnienie do środowiska dużych ilości WKT, których najwyższe stężenie stwierdzono podczas rozkładu B100 przy udziale *C. methanosorbosa DB13* (dla stężenia B100 12 % v/v, w środowisku wodnym po 10 dniu 87,6  $\mu\text{mol WKT/ml}$ ). W celu uzyskania pełnego obrazu uzyskiwanego efektu oczyszczenia środowiska z zalegającego w nim paliwa zastosowano komplementarnie fitotesty, które to są szybką i wiarygodną metodą oceny stopnia toksyczności gleby. Badania wykazały, że fitotoksyczność w gruncie rosła wraz z postępem procesów biodegradacji biopaliw i ilością biokomponentu w paliwie, niezależnie od mikroorganizmów użytych do procesu bioremediacji. Paliwa uporządkowano w szeregu od najbardziej fitotoksycznych do najmniej:

Biodiesel > Mieszanina B30 > Mieszanina B20 > Mieszanina B10 > Olej napędowy

W drugiej części badań nad mikrobiologiczną biodegradacją biodiesla, przebadano jak obecność przeciwutleniaczy (następny czynnik warunkujący przebieg degradacji) w paliwie wpłynie na efektywność oraz przebieg procesu i kondycję fizjologiczną dwóch szczepów charakteryzujących się wysokim potencjałem do rozkładu B100. Zbadano oddziaływanie przeciwutleniaczy (BHT, TBHQ, PG) o stężeniach 0,1 - 5% v/v, na efektywność biodegradacji *C. methanosorbosa DB13* i *B. subtilis P31*. Stwierdzono, że efektywność degradacji B100 istotnie była mniejsza, w obecności galusanu propylu - w stężeniu powyżej 2,5% v/v, w odniesieniu do prób nie zawierających w paliwie przeciwutleniaczy. Prawdopodobnie niekorzystny wpływ galusanu propylu związany był nie tylko z jego wysokim stężeniem czy budową chemiczną (liczba grup hydroksylowych), ale uzależniony był także od rodzaju mikroorganizmu, który wykorzystano do badań. Bakterie cechowała mniejsza odporność na obecność przeciwutleniaczy niż drożdże.

W trzeciej części badań wykazano, że podczas biodegradacji biodiesla (jako nowego typu zanieczyszczenia) konieczne jest zastosowanie, nie tylko do oceny postępu rozkładu zanieczyszczenia parametrów chemicznych, ale przede wszystkim

## Streszczenie

---

biologicznych, jako tych odzwierciedlających konsekwencje środowiskowe, wynikające z zastosowania bioaugmentacji bądź biostymulacji. Dla odzwierciedlenia ogólnego stanu fizjologicznego mikroorganizmów wyznaczono ich aktywność respiracyjną oraz aktywność dehydrogenaz w środowisku biodegradacji biodiesla uwzględniając przy tym razem obecność WKT oraz dodatek metanolu. Przeprowadzone badania wskazały, iż aktywność metaboliczna oraz aktywność dehydrogenaz podczas rozkładu FAME, niezależnie od wykorzystanego mikroorganizmu (*C. methanosorbosa* DB13, *B. subtilis* P31) była wysoka, gdy w środowisku oznaczono niską zawartość WKT. Stwierdzono, że obecność w podłożu hodowlanym dużych ilości WKT, spowodowana intensywnym rozkładem biodiesla przez drożdże *C. methanosorbosa* DB13 lub bakterie *B. subtilis* P31, jak również wysokie stężenie wyjściowe substratu, wpływają negatywnie na wykorzystywane do biodegradacji biopaliwa szczepy (np.: dla stężenia B100 5% v/v w 4 dobie  $AO = 20$ ,  $\text{mg O}_2/\text{min} \cdot \text{l}$ , ilość WKT  $42 \mu\text{mol WKT}/\text{ml}$ ). Wykazano też, że w obecności metanolu aktywność metaboliczna drożdży *C. methanosorbosa* DB13 wzrasta, natomiast u *B. subtilis* P31 spadała (w odniesieniu do próby, w której alkohol metylowy nie był obecny). W celu potwierdzenia wpływu metabolitów pośrednich, powstających w procesie biodegradacji biodiesla B100, na stosowane szczepy, oznaczono aktywność katalaz, jako wskaźnika biochemicznego stresu oksydacyjnego jak i toksycznego. W wyniku ekspozycji na szkodliwe substancje komórki badanych szczepów drożdży oraz bakterii aktywują katalazę, jako odpowiedź metaboliczną na stres środowiskowy. Najwyższe aktywności katalaz stwierdzono w środowisku degradacji biodiesla, przy wysokich ilościach WKT (np.: dla stężenia 5% v/v B100 w 1 dobie -  $45,87 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min} \cdot \text{g m.m}$ ). W środowisku degradacji oleju napędowego aktywność katalaz była niższa (dla stężenia 5% v/v ON w 1 dobie -  $0,8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min} \cdot \text{g m.m}$ ). W przypadku obecności metanolu w środowisku u obu szczepów stwierdzono aktywację aktywności katalazy (DB13 - 10 doba dla ilości Me(OH) 1,2 ml -  $3,5 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min} \cdot \text{g m.m}$ , P31 - 10 doba dla ilości Me(OH) 1,2 ml -  $3,54 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min} \cdot \text{g m}$ ).

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że dynamika procesu biodegradacji biodiesla B100, uzależniona jest, nie tylko od wytypowanego mikroorganizmu, ale też od innych czynników np.: składu chemicznego, stężenia, obecnych przeciwutleniaczy, ale też powiązana jest ściśle z biotycznymi czynnikami. Wykorzystanie mikroorganizmów efektywnie usuwających B100 ze środowiska,

## Streszczenie

---

może przynosić korzyści, ale efekt środowiskowy zostanie zmniejszony, jeśli dojdzie do zbyt szybkiego powstania i nagromadzenia pośrednich metabolitów procesu degradacji B100 tj. WKT,  $H_2O_2$  czy metanolu. Dlatego projektując proces usuwania biopaliw ze środowiska przede wszystkim należy wyselekcjonować nie tylko mikroorganizm, który efektywnie metabolizuje substancje organiczne, ale sprawdzić jak sam proces biodegradacji wpłynie na środowisko i czy nie dochodzi do powstania, a w konsekwencji nagromadzenia szkodliwych metabolitów pośrednich.