

**INSTYTUT INŻYNIERII CHEMICZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

**Agnieszka Gąszczak**

**KINETYKA MIKROBIOLOGICZNEGO ROZKŁADU  
WYBRANYCH LOTNYCH ZWIĄZKÓW  
ORGANICZNYCH**

**Autoreferat rozprawy doktorskiej**

Promotor:

**Prof. dr hab. inż. Grażyna Bartelmus**

**GLIWICE 2015**

## Spis treści

<b>1. WPROWADZENIE .....</b>	<b>3</b>
<b>2. CEL I ZAKRES PRACY.....</b>	<b>5</b>
<b>3. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH.....</b>	<b>7</b>
3.1. OCTAN WINYLU .....	7
3.2. STYREN .....	8
<b>4. SELEKCJA MIKROORGANIZMÓW DEGRADUJĄCYCH TESTOWANE LOTNE ZWIĄZKI ORGANICZNE .....</b>	<b>8</b>
<b>5. KINETYKA WZROSTU BIOMASY I BIODEGRADACJI SUBSTRATU.....</b>	<b>10</b>
5.1. STANOWISKO BADAWCZE I OPIS EKSPERYMENTÓW .....	11
5.2. SZYBKOŚĆ WZROSTU BIOMASY .....	12
5.3. SZYBKOŚĆ BIODEGRADACJI SUBSTRATU .....	17
5.4. WPŁYW TEMPERATURY NA SZYBKOŚĆ WZROSTU MIKROORGANIZMÓW .....	21
<b>6. WYZNACZENIE PARAMETRÓW PRZEMIANY PODSTAWOWEJ .....</b>	<b>22</b>
6.1. PARAMETRY KINETYCZNE HODOWLI CIĄGLEJ .....	25
6.2. WERYFIKACJA OPRACOWANYCH MODELI KINETYCZNYCH .....	30
<b>7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....</b>	<b>33</b>
<b>8. OZNACZENIA.....</b>	<b>35</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>

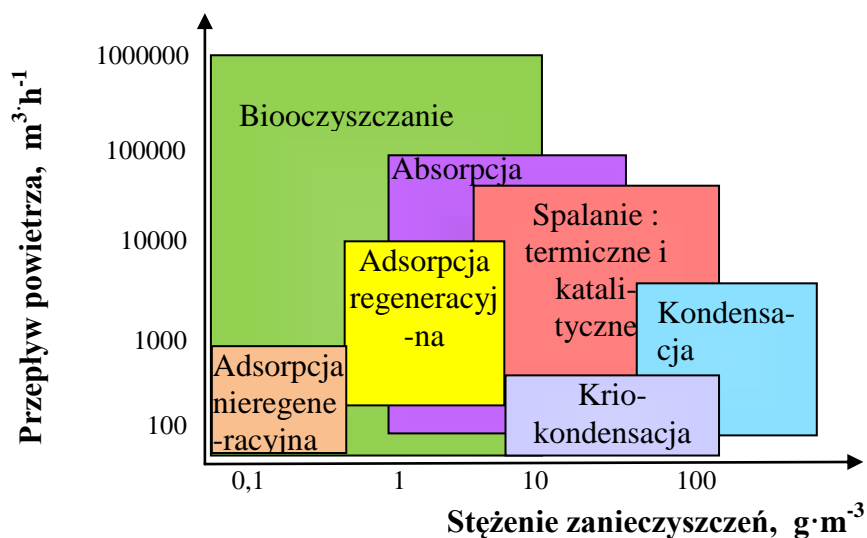
## 1. WPROWADZENIE

Środowisko naturalne człowieka to całokształt otaczających nas elementów naturalnych i antropogenicznych, wzajemnie na siebie oddziałujących. Przez wiele milionów lat ustalała się równowaga między czynnikami naturalnymi, w wyniku której powstały warunki odpowiednie dla istnienia człowieka. Poznanie sił rządzących naturą pozwoliło nam opanować ją i podporządkować własnym potrzebom. Już w drugiej połowie XIX wieku, w odpowiedzi na industrializację i urbanizację oraz coraz większy stopień zanieczyszczenia powietrza i wody, pojawiła się idea ochrony środowiska.

Spośród substancji zanieczyszczających powietrze znaczącą grupę stanowią lotne związki organiczne (LZO), substancje toksyczne i uciążliwe zapachowo, będące prekursorami ozonu troposferycznego. Większość LZO zawartych w powietrzu wprowadzana jest do środowiska w wyniku działalności człowieka, na przykład z gazami odlotowymi powstającymi przy produkcji tworzyw sztucznych, środków farmaceutycznych, środków chemii gospodarczej, a więc w przemysłach: chemicznym, gumowym, spożywczym oraz podczas malowania i lakierowania. Innymi antropogenicznymi źródłami są: transport, przeróbka i dystrybucja paliw, utylizacja odpadów i ścieków, ogrzewanie, hodowla zwierząt (GUS (2010), ekoinfo.pl, home.agh.edu.pl). Wg danych GUS, w 2013 roku emisja LZO pochodzenia antropogenicznego wynosiła w Polsce ~ 636 Gg i od lat największy udział w tej emisji mają procesy związane ze stosowaniem rozpuszczalników.

W wielu krajach, także w Polsce i wszystkich krajach UE, stosowane są normy i standardy emisyjne. Od 7 stycznia 2014 roku obowiązuje Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/75/UE z dnia 24 listopada 2010r. w sprawie emisji przemysłowych (Industrial Emissions Directive, IED), w której zapisano regulacje dotyczące wszystkich rodzajów działalności, wymagania wynikające z systemu pozwoleń zintegrowanych, przepisy dotyczące emisji lotnych związków organicznych, spalania odpadów, itp.

Zaniepokojenie stopniem skażenia Ziemi przyczyniło się do rozwoju technik ochrony środowiska. Ze względu na złożony skład chemiczny i różne warunki procesowe nie ma jednego uniwersalnego sposobu oczyszczania gazów odlotowych. Dokonując wyboru najlepszej technologii należy wziąć pod uwagę: ilość oczyszczanego powietrza, skład i stężenie zanieczyszczeń, a także koszt i efektywność proponowanej metody (Kennes i Veiga (2001)). Orientacyjne zakresy stosowania poszczególnych metod, w zależności od wielkości oczyszczanego strumienia i stężenia zanieczyszczenia, przedstawiono na rysunku 1.1.



Rys.1.1. Obszary stosowania różnych technik oczyszczania powietrza (Deshusses (2005)).

Metody biologiczne są atrakcyjne zarówno pod względem ekonomicznym (są stosunkowo tanie, zużywają mniej energii) jak i z punktu widzenia ochrony środowiska (są to naturalne procesy prowadzone w optymalnych dla ich przebiegu warunkach). Mogą być stosowane nawet dla bardzo dużych strumieni powietrza, pod warunkiem że usuwana substancja jest rozpuszczalna (nawet słabo) w wodzie, a stężenie zanieczyszczenia nie przekracza  $\sim 10 \text{ g/m}^3$ . Oczyszczane powietrze nie może zawierać substancji trujących dla mikroorganizmów (np. metali ciężkich), a jego temperatura powinna mieścić się w zakresie odpowiadającym aktywności biologicznej stosowanych drobnoustrojów. Dużą zaletą metod biologicznych jest fakt, że nie powodują one przesunięcia zanieczyszczenia z jednej fazy do drugiej (z gazu do cieczy lub ciała stałego), ale całkowite rozłożenie ich na ditlenek węgla i wodę.

Przedmiotem analizy niniejszej pracy jest jeden z kluczowych etapów procesu biooczyszczania powietrza z lotnych związków organicznych, a mianowicie reakcja biodegradacji zanieczyszczenia przez wyselekcjonowany szczep mikroorganizmów.

## 2. CEL I ZAKRES PRACY

Prezentowane badania stanowiły pierwszy i niezwykle istotny etap prac związanych z realizacją projektu rozwojowego NR 14 0112-10/2010, finansowanego przez NCBiR, którego ostatecznym celem było opracowanie technologii oczyszczania powietrza z wybranych lotnych związków organicznych w trójfazowym bioreaktorze ze stałym złożem (ang. *trickle-bed bioreactor*, *TBB*). Jak widać z przedstawionego schematu (rys 2.1), przed uruchomieniem bioreaktora strużkowego niezbędna była realizacja prac, w wyniku których :

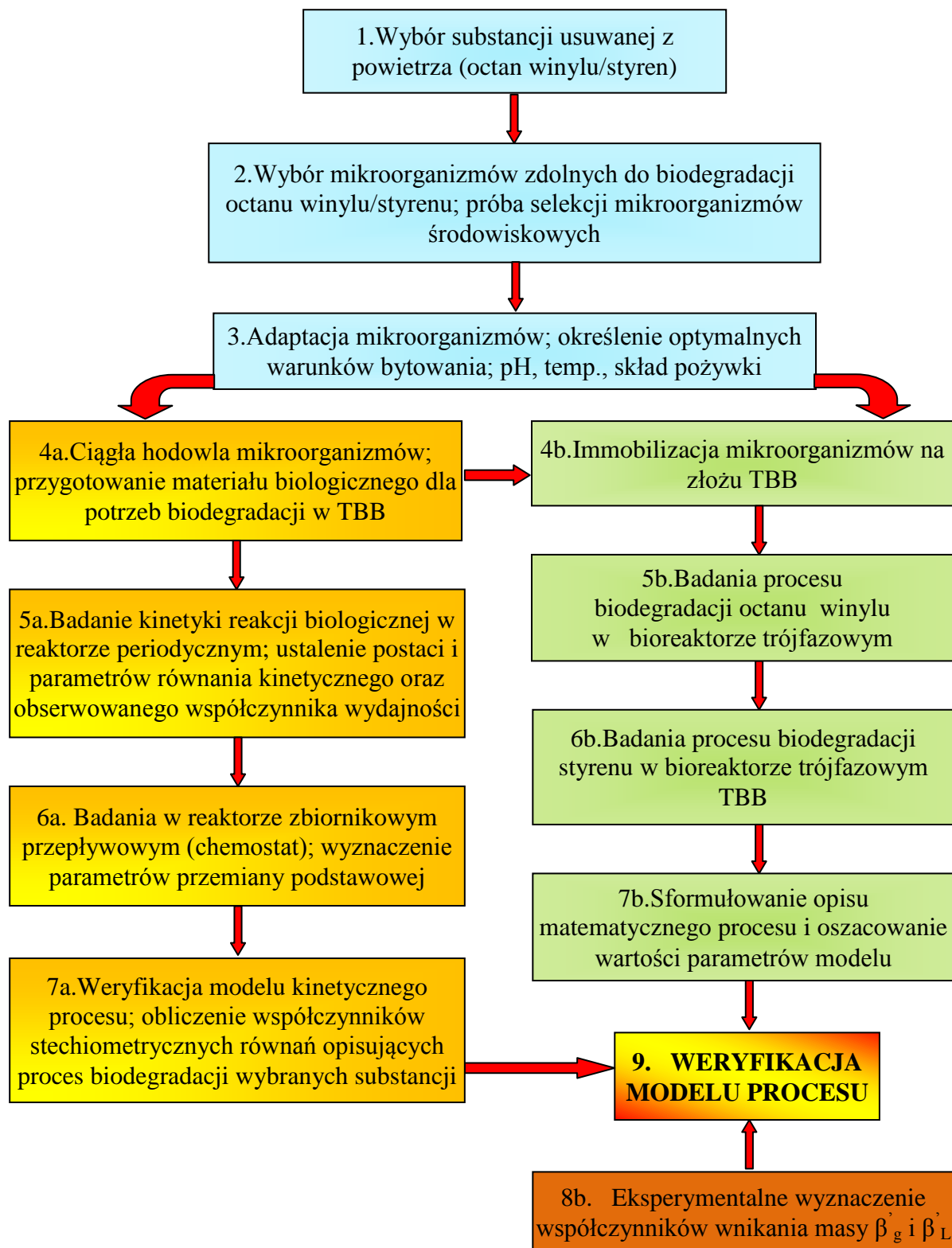
- *wybrano substancje z grupy lotnych związków organicznych, które będą usuwane z powietrza,*
- *wyselekcjonowano mikroorganizmy degradujące efektywnie wybrane zanieczyszczenia i określono najkorzystniejsze warunki ich wzrostu; są to późniejsze parametry pracy reaktora strużkowego, na powierzchni którego immobilizowane są wyselekcjonowane szczepy.*

Ujęcie ilościowe zjawisk zachodzących w bioreaktorze – niezależnie od typu bioreaktora – wymaga sporządzenia odpowiednich bilansów masowych, w których konieczna jest znajomość wyrażenia określającego szybkość biodegradacji usuwanego zanieczyszczenia w wyniku reakcji biologicznej. Wobec braku danych literaturowych, konieczne było:

- *wyznaczenie postaci i parametrów równań opisujących szybkość biodegradacji wybranych zanieczyszczeń przez wyselekcjonowane mikroorganizmy,*
- *wyznaczenie parametrów przemiany podstawowej,*
- *weryfikacja opracowanego modelu kinetycznego procesu w oparciu o własną bazę danych eksperymentalnych,*
- *wyznaczenie współczynników stechiometrycznych równań opisujących proces rozkładu substratu (LZO) i tworzenia biomasy, których znajomość umożliwia sterowanie procesem w TBB.*

Działania te stanowią ważny etap prac nad opracowywaną technologią, gdyż mają istotny wpływ na jej efektywność.

W kolejnych rozdziałach zostaną omówione zadania ujęte w blokach 1-3, 4a-7a schematu, przedstawionego na rys. 2.1.



Rys.2.1. Schemat prac, których realizacja jest niezbędna dla zaprojektowania efektywnego procesu biooczyszczania powietrza w reaktorze strużkowym.

### **3. CHARAKTERYSTYKA WYBRANYCH LOTNYCH ZWIĄZKÓW ORGANICZNYCH**

Spośród ogromnej liczby lotnych związków organicznych, w wyniku konsultacji z przedstawicielami przemysłu (m. in. firma SYNTHOS S.A., czołowy producent tworzyw na bazie styrenu i dyspersji winylowych) jako testowe zanieczyszczenia wybrano octan winylu oraz styren. Wybór ten podyktowany był ogromną skalą produkcji i wykorzystania obu związków oraz odmiennością budowy chemicznej obu substancji, która ma niewątpliwy wpływ na ich biologiczny rozkład. Octan winylu to ester alifatyczny uważany za łatwo biodegradowalny, natomiast związki aromatyczne, do których należy styren, ze względu na budowę pierścienia oraz obecność w nim podstawników aktywujących bądź dezaktywujących pierścień, zaliczane są do substancji trudno biodegradowalnych (Greń i wsp. (2008)).

#### **3.1. Octan winylu**

W 2012 roku wyprodukowano 6,5 miliona ton octanu winylu i analitycy przewidują, że jego produkcja będzie wzrastać corocznie o ~ 4%. W przemyśle związek ten jest powszechnie stosowany do produkcji polichlorku winylu, podstawowego składnika mas wiążących klejów, farb emulsyjnych, tworzyw powłokowych oraz wielu polimerów i kopolimerów. W przypadku uwolnienia do atmosfery, octan winylu bierze udział w reakcjach fotochemicznych, zaś w wodzie ulega hydrolizie do kwasu octowego i aldehydu octowego.

Octan winylu niekorzystnie oddziałuje na człowieka, gdyż jest substancją drażniącą śluzówki oczu i górnych dróg oddechowych oraz zaburza prawidłowe funkcjonowanie ośrodkowego układu nerwowego. Istotnym faktem jest, iż w krótkim czasie po kontakcie z octanem winylu we krwi człowieka i tkankach zwierzęcych pojawia się aldehyd octowy, zaliczany do substancji wysoce toksycznych (Simon i wsp. (1985)).

Budowa cząsteczki octanu winylu wskazuje, że powinien stosunkowo łatwo ulegać biodegradacji do ditlenku węgla i wody, i zapewne dlatego w literaturze jest niewiele informacji na temat jego rozkładu przez mikroorganizmy. Nieder i wsp. (1990) zaproponowali szlak degradacji octanu winylu w komórkach gramujemnego szczepu bakterii, opisanego symbolem V2. Produktami hydrolizy wiązania estrowego były kwas octowy i aldehyd octowy, powstały w wyniku tautomeryzacji nietrwałego alkoholu winylowego, bezpośredniego produktu hydrolizy octanu winylu. Aldehyd octowy ulegał utlenieniu do kwasu octowego lub redukcji do alkoholu, który również był metabolizowany do kwasu octowego, którego dalszy metabolizm polegał na włączeniu go w przemiany w obrębie cyklu Krebsa.

### 3.2. Styren

Wielkość produkcji (32,1 mln ton/rok) i powszechność zastosowania styrenu (produkcja tworzyw sztucznych, styropianu) sprawiają, że stał się on uciążliwy dla środowiska. Może zanieczyszczać powietrze, wodę i glebę, jednak z wody i gleby szybko odparowuje. Uwolniony do atmosfery szybko reaguje z rodnikami hydroksylowymi i ozonem, uczestnicząc w tworzeniu smogu i wtórnego, niekontrolowanego zanieczyszczenia powietrza.

U osób narażonych na kontakt ze styrenem mogą wystąpić objawy zatrucia ostrego lub przewlekłego, w zależności od dawki, czasu i częstotliwości ekspozycji. Podczas bezpośredniej inhalacji substancja ta jest pochłaniana w 60-90% i osadza się głównie w tkance tłuszczowej. Jest metabolizowany w wątrobie, głównie szlakiem prowadzącym przez tlenek styrenu, glikol styrenowy, kwas migdałowy lub benzoesowy do kwasu fenyloglioksyłowego. Kwasy migdałowy oraz fenyloglioksyłowy są wydalane z moczem (WHO (2003)). W przypadku zatrucia przewlekłego, objawami są przewlekłe zapalenie skóry, przewlekłe zapalenie spojówek, upośledzenie węchu, zaburzenia funkcji psychicznych, spowolnienie reakcji, zmiany w zapisie elektroencefalograficznym. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer, IARC) zakwalifikowała styren do grupy 2B. Jako możliwe nowotwory wskazano białaczkę, chłoniaki i nowotwór krtani (WHO (2000), Styrene - Report on Carcinogens (2011), Kluska (2010)).

Mikrobiologiczny rozkład styrenu w warunkach tlenowych przebiegać może dwoma, zupełnie niezależnymi szlakami i aktywacja jednego z nich uzależniona jest od zestawu genów w genomie danego mikroorganizmu (O'Leary i wsp. (2002), Warhurst i wsp. (1994), Bestetti i wsp. (2004)). Jeden ze szlaków polega na utlenieniu łańcucha bocznego, natomiast drugi związany jest z reakcjami zachodzącymi bezpośrednio w pierścieniu aromatycznym.

## 4. SELEKCJA MIKROORGANIZMÓW DEGRADUJĄCYCH TESTOWANE LOTNE ZWIĄZKI ORGANICZNE

Procesy samooczyszczania się środowiska sugerują, że w miejscach występowania danego zanieczyszczenia oczekiwać można we florze bakteryjnej gleby szczepów zdolnych do jego rozkładu. Metodą najczęściej wykorzystywaną do izolacji szczepów ze środowisk naturalnych jest tzw. technika wzbogacania kultur (ang. *enrichment culture technique*).

We współpracy z Katedrą Biochemii Uniwersytetu Śląskiego podjęto próbę wyizolowania szczepów bakterii zdolnych do rozkładu testowanych zanieczyszczeń. W tym celu pobrano próbki gleby na terenie SYNTHOS S.A. w Oświęcimiu, z kilku stanowisk



leżących w pobliżu instalacji przetwarzających oba związki. Spośród wyizolowanych 12 szczepów jedynie dwa, oznaczone jako EC1\_2004 i EC3\_2001, zdolne były do wzrostu i rozkładu octanu winylu w stężeniu 400 ppm, wprowadzanym co 24 godziny. W oparciu o wyniki amplifikacji genu kodującego 16SrRNA oba szczepy zakwalifikowano jako *Pseudomonas putida* (procent zgodności 96%). Do dalszych badań nad mikrobiologicznym rozkładem octanu winylu wybrano szczep EC3\_2001 oraz zakupiony w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu) szczep laboratoryjny *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123, który efektywnie degradował badany wcześniej octan etylu. Nie pozyskano, niestety, szczepu degradującego styren. W tej sytuacji, w oparciu o analizę danych literaturowych (Arnold i wsp. (1997)), podjęto decyzję o zakupie rozkładającego styren szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486, zdeponowanego w VTT Culture Collection, Technical Research Centre of Finland. Szczep ten wyizolowany został z wypełnienia biofiltra wypełnionego torfem, przez który przepuszczano przez kilka miesięcy powietrze zanieczyszczone styrenem. Analizy wykazały 97% podobieństwo szczepu E-93486 do *Pseudomonas putida* i 97% podobieństwo do *Pseudomonas stutzeri*.

Przed przystąpieniem do badań związanych z biodegradacją testowanych substancji:

- sprawdzono aktywność głównych enzymów, decydujących o przebiegu szlaków rozkładu degradowanych substancji
- określono najkorzystniejsze dla wzrostu wyselekcjonowanych mikroorganizmów warunki hodowli

Dla octanu winylu jako substratu wzrostowego sprawdzono w pierwszej kolejności aktywność esterazy w surowej frakcji komórkowej oraz w płynie hodowlanym. We wszystkich testowanych próbkach stwierdzono aktywność esterazy jedynie w surowej frakcji cytoplazmatycznej, co sugeruje, że jest to enzym wewnątrzkomórkowy bądź białko związane z błoną cytoplazmatyczną. Kolejnym krokiem było potwierdzenie obecności dehydrogenaz alkoholowej i aldehydowej w surowej frakcji komórkowej. Ich obecność wydaje się potwierdzać, że częściowa transformacja aldehydu do alkoholu etylowego jest mechanizmem obronnym mikroorganizmów przed toksycznym działaniem tego związku. W ten sposób potwierdzony został, zaproponowany przez Niedera i wsp. (1990), szlak degradacji octanu winylu.

W celu sprawdzenia, czy szczep *Pseudomonas* sp. E-93486 rozkłada styren w szlaku utlenienia łańcucha bocznego, wykazano obecność w jego komórkach monooksygenazy styrenowej i izomerazy tlenku styrenu, co potwierdza przebieg jego biodegradacji szlakiem zaproponowanym przez O'Leary i wsp. (2002).

Do najważniejszych czynników środowiskowych wpływających na przyrost biomasy należą temperatura oraz odczyn pH środowiska. Aby określić najkorzystniejsze dla testowanych szczepów warunki wzrostu założono hodowle w bulionie odżywczym i prowadzono je w różnych temperaturach (22-39°C) i przy różnym odczynie pH (5-8). Spośród badanych temperatur inkubacji w bogatym podłożu odżywczym, największy przyrost biomasy obserwowano dla hodowli prowadzonych w temperaturze 30°C. Dla wszystkich szczepów najmniej korzystne było środowisko o odczynie pH 5, w pozostałych uzyskano zbliżone przyrosty biomasy. Dalsze badania były więc prowadzone w temperaturze 30°C i przy pH 7.

## **5. KINETYKA WZROSTU BIOMASY I BIODEGRADACJI SUBSTRATU**

Parametry modelu kinetycznego opisującego wzrost mikroorganizmów wyznacza się w oparciu o serię eksperymentów, wykonywanych w reaktorze okresowym, podczas których obserwuje się wzrost biomasy w czasie, przy różnych początkowych stężeniach substratu wzrostowego. W fazie wzrostu logarytmicznego, w której właściwa szybkość wzrostu jest stała ( $\mu_{net}$ ) i zależna jedynie od początkowego stężenia substratu, szybkość zmian stężenia biomasy opisuje zależność:

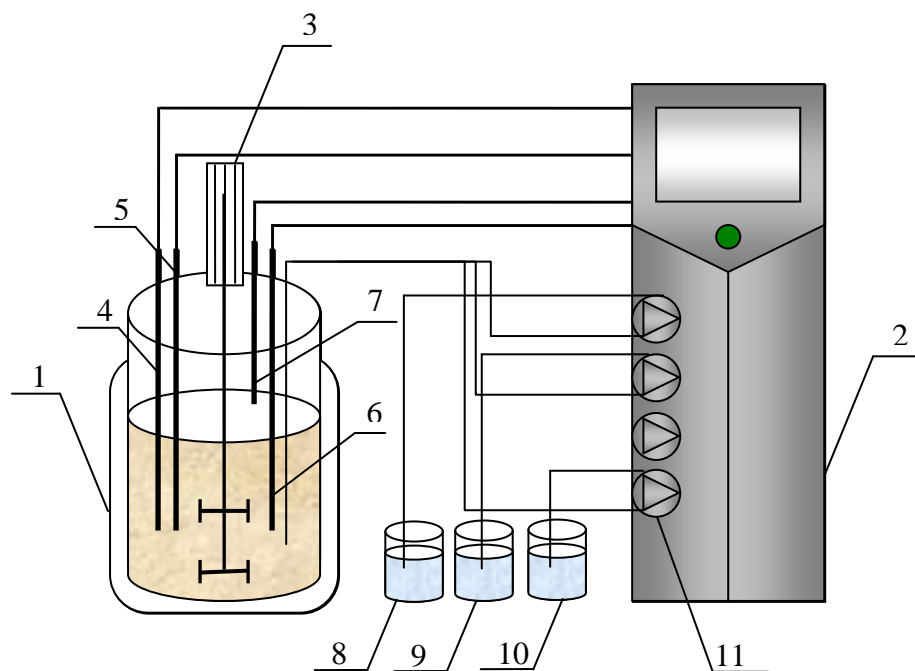
$$\frac{dX}{dt} = \mu_{net}X \quad 5.1$$

Całkując zależność (5.1), przy znanych warunkach początkowych tj. dla  $t=t_0$ ,  $X=X_0$  otrzymuje się:

$$\ln X = \mu_{net}(t - t_0) - \ln X_0 \quad 5.2$$

Tak więc dla każdego punktu eksperymentalnego tj. dla każdej początkowej dawki substratu, wykres zależności  $\ln X=f(t)$  jest linią prostą, której współczynnik kierunkowy określa szukaną wartość  $\mu_{net}$ . Zmieniając w szerokim zakresie stężenie początkowe substratu wzrostowego w roztworze uzyskuje się bazę danych  $\mu_{net} = f(S_{t0})$ , umożliwiającą wybór postaci i estymację stałych równania opisującego wzrost biomasy.

## 5.1. Stanowisko badawcze i opis eksperymentów



1- bioreaktor z  
płaszczem  
wodnym

2- jednostka sterująca

3- mieszadło

11- pompy perystaltyczne

czujniki:

4- pH,

5- pO<sub>2</sub>,

6- temperatury,

7- poziomu cieczy

zbiorniki:

8- 10% r-r KOH,

9- 10% r-r KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

10- 0,75% r-r H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Rys.5.1. Schemat stanowiska badawczego.

Hodowle okresowe mikroorganizmów prowadzono w bioreaktorze Biostat B firmy Sartorius (USA) o objętości roboczej  $\sim 2,7 \text{ dm}^3$ . Schemat stanowiska badawczego przedstawiono na rysunku 5.1.

Bioreaktor (1) wyposażony był w czujnik temperatury (6), elektrody pH (4) i pO<sub>2</sub> (5) oraz czujnik poziomu cieczy (7), przesyłające sygnały do jednostki sterującej (2). Stała temperatura hodowli utrzymywana była za pomocą płaszcza wodnego, natomiast pH roztworu poprzez dozowanie 10% roztworu KOH (8) lub KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (9) wg wskazań elektrody pH. Substratami wzrostowymi były lotne związki organiczne, zatem nie było możliwe napowietrzanie roztworu. Po przeprowadzeniu prostego testu aktywności katalazy (Takeuchi i wsp. (1996)) zdecydowano, że stałe stężenie tlenu w roztworze utrzymywane będzie poprzez dozowanie 0,75% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wg wskazań elektrody pO<sub>2</sub>. Hodowle prowadzono w temperaturze 30°C, przy stężeniu tlenu w roztworze wynoszącym  $5 \text{ mg/dm}^3$ , pH środowiska równym  $7 \pm 0,1$  i przy obrotach mieszadła (3)  $300 \text{ min}^{-1}$ .

Zaadaptowane do rozkładu wybranego substratu komórki bakterii pobierano z hodowli podstawowej, odwirowywano (5500 rpm, 10 minut) i przemywano roztworem pożywki mineralnej. Z tak przygotowanych komórek i pożywki mineralnej sporządzano zawiesinę o stężeniu  $\sim 9 \cdot 10^{-2} [\text{g}_{\text{s.m.}} \cdot \text{dm}^{-3}]$  (*Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 lub *Pseudomonas putida* EC3\_2001) lub  $\sim 5,31 \cdot 10^{-2} [\text{g}_{\text{s.m.}} \cdot \text{dm}^{-3}]$  (*Pseudomonas* sp. E-93486). Tak sporządzoną zawiesinę bakterii ( $V_1=2 \text{ dm}^3$ ) przenoszono do sterylnego bioreaktora do którego, po ustabilizowaniu się parametrów procesu, wprowadzano odpowiednią dawkę substratu. W czasie trwania hodowli oznaczano stężenie biomasy oraz stężenie substratu i pośrednich produktów metabolizmu.

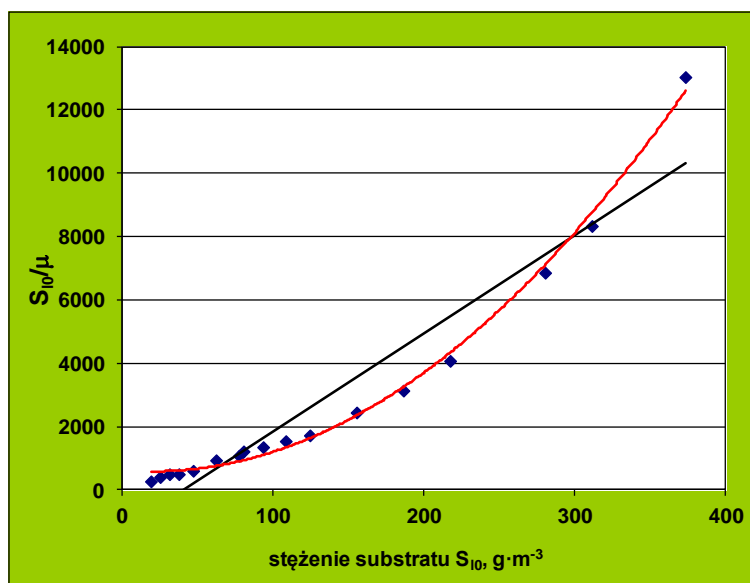
Stężenie mikroorganizmów oznaczano metodą spektrofotometryczną ( $\lambda=550 \text{ nm}$ ), natomiast stężenie substratów wzrostowych oraz produktów pośrednich ich rozkładu oznaczano chromatograficznie (chromatograf gazowy firmy Varian 3800, wyposażony w kolumnę CP-wax 52 CB i detektor FID). Hodowlę prowadzono zawsze co najmniej do momentu wyczerpania substratu wzrostowego.

## 5.2. Szybkość wzrostu biomasy

Do badań związanych z rozkładem mikrobiologicznym octanu winylu w bioreaktorze okresowym wybrano wyizolowany szczep *Pseudomonas* sp. EC3\_2001 oraz laboratoryjny szczep *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123. Eksperymenty wykazały, że szczepy prezentują odmienne sposoby biodegradacji substratu. Pojawienie się aldehydu octowego w hodowli *Pseudomonas putida* EC3\_2001 powodowało ograniczenie wzrostu biomasy, a cała dostępna energia wykorzystywana była prawdopodobnie na przekształcenie aldehydu octowego w kwas octowy lub etanol. W przypadku *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 nie stwierdzono obecności aldehydu octowego w płynie hodowlanym w całym zakresie testowanych stężeń. Dalsze badania prowadzono więc z wykorzystaniem laboratoryjnego szczepu *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123. Przed rozpoczęciem hodowli przeprowadzono szereg prób abiotycznych, których celem było sprawdzenie szybkości nieenzymatycznej hydrolizy octanu winylu. Stwierdzono, że po 24 godzinach stężenie substratu zmniejszyło się o  $\sim 16\%$ , w czasie odpowiadającym badaniom kinetycznym ( $\sim 10$  godzin) nie stwierdzono znaczących zmian octanu winylu w wyniku hydrolizy nieenzymatycznej.

Założono kilkanaście hodowli, w których początkowe stężenie substratu wzrostowego zmieniano w zakresie od 18,6 do 372,8  $[\text{g} \cdot \text{m}^{-3}]$ . Zgromadzona została w ten sposób baza danych  $\mu_{\text{net}} = f(S_{I0})$ , którą przedstawiono na rysunku 5.2 w formie zależności

$\frac{S_{I0}}{\mu_{net}} = f(S_{I0})$ . Punkty układają się wzdłuż krzywej, której kształt wskazuje jednoznacznie na inhibicję wzrostu biomasy przez substrat.



Rys.5.2. Wykres zależności  $S_{I0} / \mu_g = f(S_{I0})$  dla biodegradacji octanu winylu przez *Pseudomonas fluorescens* PCM2123.

W literaturze można znaleźć wiele propozycji równań opisujących kinetykę wzrostu mikroorganizmów inhibitowaną substratem (Singh i wsp. (2006), Agarry i wsp. (2008), Moser (1988)). Najczęściej stosowane jest równanie Andrewsa (1968), które dla  $K_I \gg K_S$  przyjmuje postać zależności, zaproponowanej w 1930 r. przez Haldane dla opisanie kinetyki reakcji enzymatycznej inhibitowanej substratem. Stąd w wielu opracowaniach równanie to nazywane jest równaniem Haldane.

Tabela 5.1. Równania opisujące kinetykę wzrostu biomasy inhibitowaną substratem.

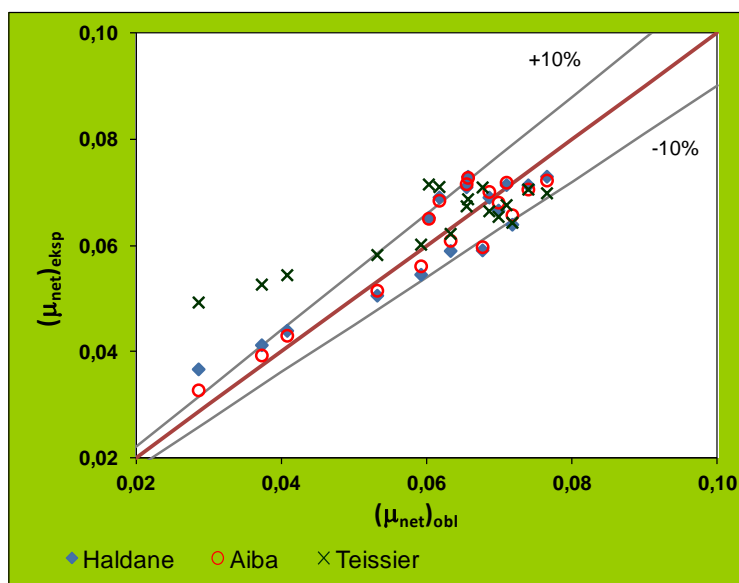
L.p.	Autor	Model
1	Haldane	$\mu = \mu_{max} S / \left( K_S + S + \left( \frac{S^2}{K_I} \right) \right)$
2	Webb	$\mu = \mu_{max} S \left( 1 + \frac{S}{K} \right) / \left( K_S + S + \left( \frac{S^2}{K_I} \right) \right)$
3	Aiba	$\mu = \left( \frac{\mu_{max} S}{(K_S + S)} \right) \exp \left( - \frac{S}{K_I} \right)$
4	Teissier	$\mu = \mu_{max} \left( \exp \left( - \frac{S}{K_I} \right) - \exp \left( - \frac{S}{K_S} \right) \right)$
5	Yano -Koga	$\mu = \mu_{max} S / \left( K_S + S + \left( \frac{S^2}{K_1} \right) + \left( \frac{S^3}{K_2^2} \right) \right)$

Inne formy równania kinetycznego zaproponowali Webb(1963), Yano i wsp. (1966), Aiba i wsp. (1968) czy Teissier (1936). W tabeli 5.1 zestawiono postacie tych równań, zaczerpnięte z prac Singha i wsp. (2008) i Agarry i wsp. (2008). W oparciu o własną bazę danych eksperymentalnych wyestymowano stałe wszystkich wymienionych równań (metoda najmniejszych kwadratów, program NLREG (Sherrod (1997))).

Testowane równania przybliżają eksperymentalne dane ze średnim błędem procentowym nie przekraczającym 11% (rys.5.3). W związku z tym w dalszej części pracy dla opisu wzrostu szczepu *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 na octanie winylu stosowane będzie równanie Haldane ( $e_y = 8,42\%$ ) w postaci:

$$\mu = \frac{0,1202 \cdot S}{17,195 + S + \frac{S^2}{166,88}} \quad 5.3$$

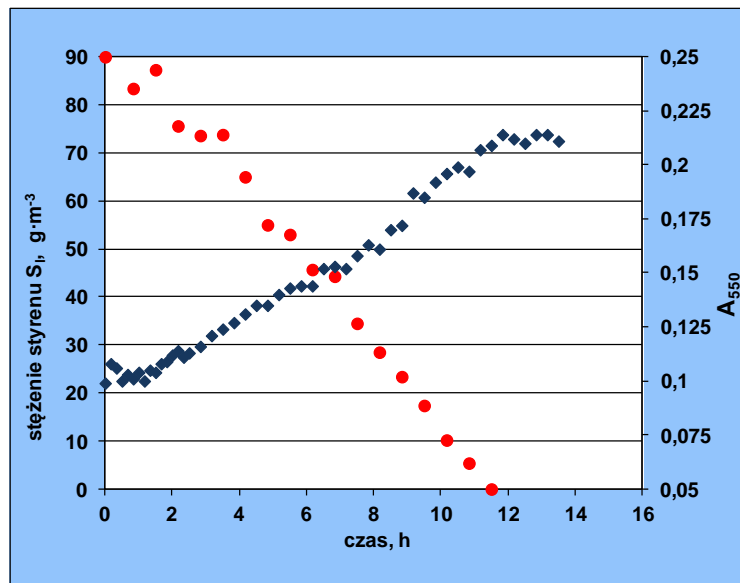
Niestety nie można porównać rezultatów przeprowadzonych badań z wynikami uzyskanymi przez innych autorów gdyż w literaturze nie znaleziono danych dotyczących kinetyki biodegradacji octanu winylu przez mikroorganizmy.



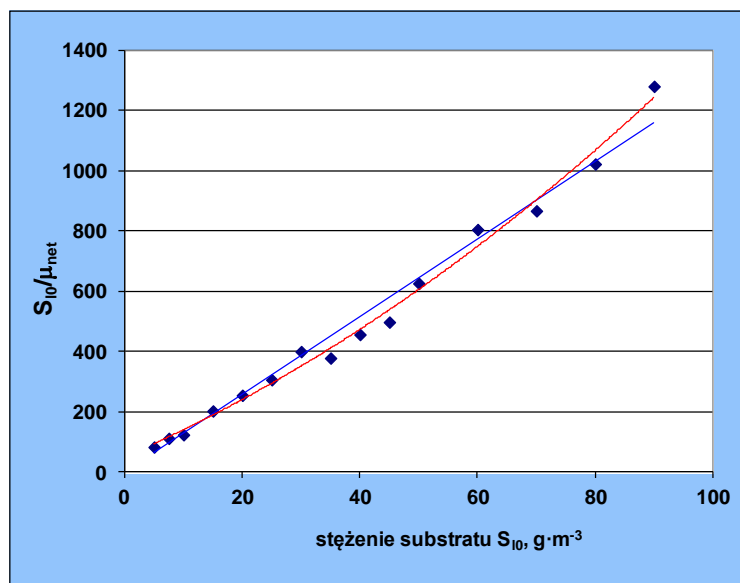
Rys.5.3. Porównanie wartości  $\mu_{net}$  otrzymanych eksperymentalnie i obliczonych z równań Haldane, Aiby i Teissiera.

W celu wyznaczenia postaci i stałych równania opisującego szybkość biodegradacji styrenu przez szczep *Pseudomonas* sp. E-93486 zastosowano procedury opisane powyżej. Badania obejmowały serię hodowli prowadzonych dla różnych początkowych dawek substratu wzrostowego, zmienianych w zakresie od  $5 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$  do  $90 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ . Stosowany zakres zmian stężenia substratu jest ściśle związany z warunkami hodowli adaptacyjnej określonymi przez dostawcę mikroorganizmów. Przebieg pojedynczego eksperymentu w postaci krzywej

wzrostu populacji oraz ubytku substratu dla początkowego stężenia styrenu równego  $90 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$  przedstawia rysunek 5.4.



Rys. 5.4. Krzywe ubytku substratu i wzrostu biomasy dla różnych początkowych stężeń styrenu w roztworze.  $S_{10}=90 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ .



Rys.5.5. Wykres zależności  $S_{10}/\mu_g=f(S_{10})$  dla biodegradacji styrenu przez bakterie *Pseudomonas sp.* E-93486.

Zgromadzoną w ten sposób bazę danych  $\mu_g=f(S_{10})$  przedstawiono na rysunku 5.5 w formie zależności  $S_{10}/\mu_g=f(S_{10})$ .

Nieco wyższy współczynnik korelacji ( $R^2=0,992$ ) otrzymano korelując dane równaniem kwadratowym, co wskazuje na niewielką inhibicję wzrostu biomasy przy większych stężeniach substratu wzrostowego. Dla dostępnych w literaturze zależności opisujących tego typu wzrost mikroorganizmów wyestymowano wartości stałych (metoda

najmniejszych kwadratów, program NLREG (Sherrod (1997)). Wyestymowano również stałe równania Monoda, które w badanym zakresie zmian stężenia substratu wzrostowego, również w miarę poprawnie przybliża dane eksperymentalne.

Wszystkie testowane zależności przybliżają eksperymentalne dane ze średnim błędem procentowym  $e_y$  nie przekraczającym 7%. W dalszej części pracy dla opisu wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 stosowane będą równania:

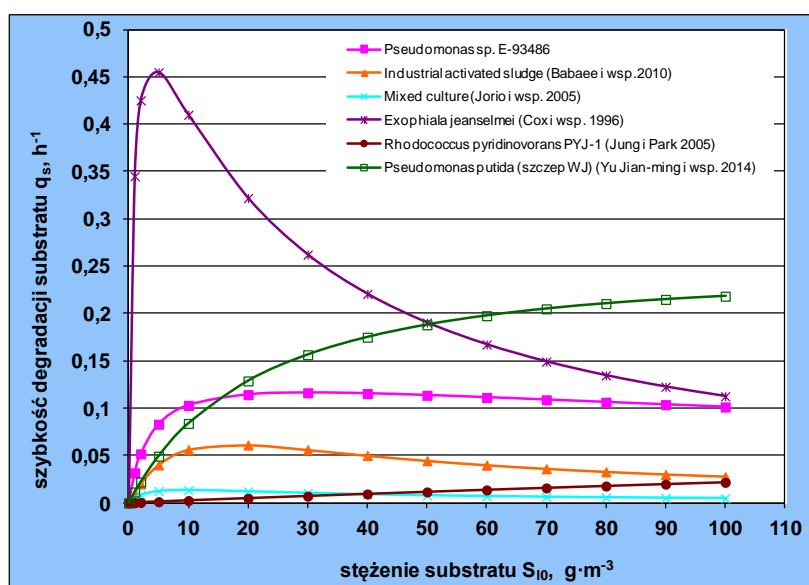
- Haldane ( $e_y = 5,5\%$ )

$$\mu = \frac{0,1029 \cdot S}{3,514 + S + \frac{S^2}{265,26}} \quad 5.4$$

- Monoda ( $e_y = 6,3\%$ )

$$\mu = \frac{0,0818 \cdot S}{1,451 + S} \quad 5.5$$

Pomimo dużego zainteresowania badaczy biodegradacją styrenu - pierwsze prace ukazały się już w latach siedemdziesiątych XX wieku - niewiele publikacji poświęcono kinetyce biodegradacji tego związku. Dostępne dane literaturowe (Cox i wsp. (1997), Jorio i wsp. (2005), Jung i Park (2005), Babaei i wsp. (2010), Yu Jian-ming i wsp. (2014)) przedstawiono na wykresie w postaci zależności właściwej szybkości asymilacji substratu od stężenia styrenu (rys.5.6).



Rys. 5.6. Porównanie uzyskanych przez różnych autorów zależności właściwej szybkości biodegradacji styrenu od początkowego stężenia tego związku w roztworze.



Analizując przedstawione powyżej porównanie danych literaturowych oraz wyniki własnych badań stwierdzono, że jedynie stosowane przez Coxa i wsp. (1997) grzyby *Exophiala jeanselmei* wykazywały znacznie wyższą aktywność niż badane w niniejszej pracy i pracy Yu Jian-minga i wsp. (2014) szczepy z rodzaju *Pseudomonas*. Należy przy tym zauważyć, że aktywność wspomnianych grzybów gwałtownie malała ze wzrostem stężenia substratu w roztworze podczas gdy bakterie *Pseudomonas* sp. wykazywały znaczną odporność na inhibitujący ich wzrost wpływ wyższych stężeń styrenu. Cecha ta powoduje, że testowany szczep można zarekomendować jako dobry materiał biologiczny do zastosowania w przemysłowych procesach oczyszczania powietrza i ścieków ze styrenu. Szczep pracujący stabilnie w szerokim zakresie zmian stężenia zanieczyszczenia zapewni również stabilną efektywność procesu.

### 5.3. Szybkość biodegradacji substratu

W procesach oczyszczania powietrza lub ścieków kluczowym parametrem, stanowiącym o efektywności zastosowanej metody, jest stopień konwersji rozkładanego przez mikroorganizmy zanieczyszczenia. Parametrem umożliwiającym transformację równania, opisującego szybkość wzrostu mikroorganizmów, w równanie, opisujące szybkość biodegradacji substratu wzrostowego jest tzw. współczynnik wydajności biomasy  $Y_{XS}$ .

Ubytek masy substratów wzrostowych, którymi w niniejszej pracy są lotne związki organiczne, przy założeniu że pomiędzy gazem i cieczą ustala się stan równowagi termodynamicznej, powiązany jest ze wzrostem stężenia biomasy zależnością (Jorio i wsp., 2005):

$$\frac{dm_s}{dt} = -\frac{V_l}{(Y_{xs})_{obs}} \frac{dX_b}{dt} = (V_l + H^*V_g) \frac{dS_l}{dt} \quad 5.6$$

gdzie

$$m_s = V_l S_l + V_g S_g = V_l S_l + V_g H^* S_l \quad 5.7$$

to masa substratu wzrostowego (lotny związek organiczny) dodana do reaktora,  $H^*$  to tzw. współczynnik podziału substratu (bezwymiarowa stała Henry'ego), natomiast  $V_g$  i  $V_l$  to objętość fazy gazowej i ciekłej w reaktorze.

Równanie 5.6 zapisać można w postaci:

$$r_x = \frac{dX_b}{dt} = (Y_{xs})_{obs} \left( \frac{V_l + H^*V_g}{V_l} \right) \left( -\frac{dS_l}{dt} \right) = (Y_{xs})_{obs} \left( \frac{V_l + H^*V_g}{V_l} \right) r_s \quad 5.8$$

lub

$$\mu_{net} = \frac{1}{X_b} \frac{dX_b}{dt} = (Y_{xs})_{obs} \left( 1 + H^* \frac{V_g}{V_l} \right) q_s \quad 5.9$$

gdzie

$$q_s = - \frac{1}{X_b} \frac{dS_l}{dt} \quad 5.10$$

to tzw. właściwa szybkość konsumpcji substratu.

Całkując zależność (5.6) w przedziale czasu trwania testu otrzymuje się zależność:

$$X_b = X_{b0} + (Y_{xs})_{obs} \left( 1 + H^* \frac{V_g}{V_l} \right) (S_{l0} - S_l) \quad 5.11$$

w której

$$S_{l0} = \frac{m_{s0}}{V_l + H^* V_g} \quad 5.12$$

to początkowe stężenie substratu wzrostowego w roztworze. Z równania (5.11) wyznaczyć można wartość  $(Y_{xs})_{obs}$ :

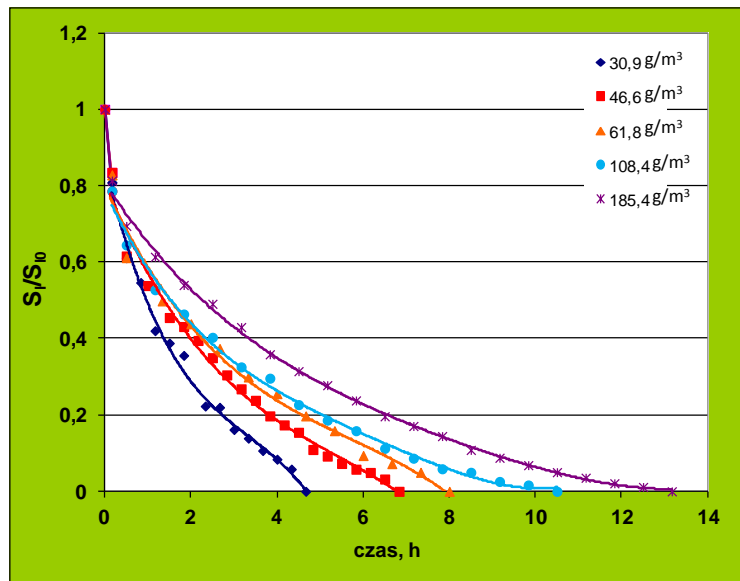
$$(Y_{xs})_{obs} = \left( \frac{X_b - X_{b0}}{S_{l0} - S_l} \right) \left( \frac{V_l}{V_l + H^* V_g} \right) \quad 5.13$$

Jeśli w fazie zrównoważonego wzrostu substrat wzrostowy wyczerpywany jest całkowicie ( $S_l = 0$ ) wówczas zależność 5.13 upraszcza się do postaci:

$$(Y_{xs})_{obs} = \frac{X_b - X_{b0}}{\frac{m_{s0}}{V_l}} \quad 5.14$$

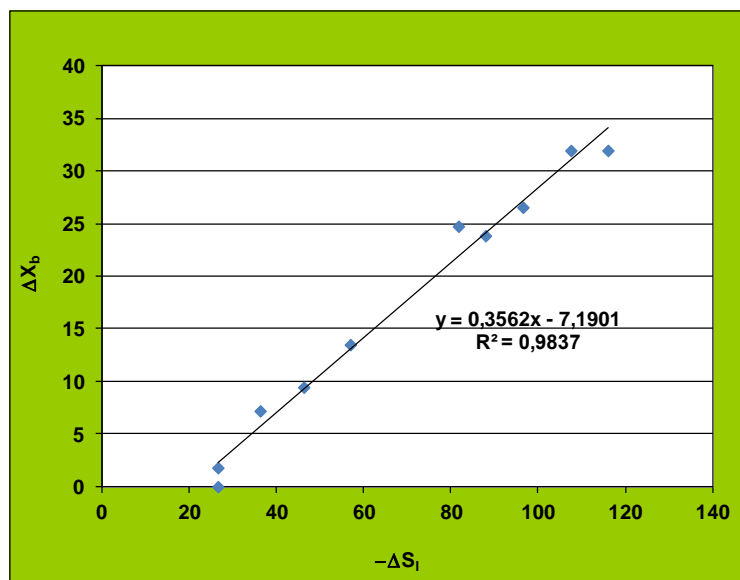
Jak widać, dla wyznaczenia współczynnika wydajności konieczne jest śledzenie w trakcie każdej hodowli zmian w czasie stężenia substratu wzrostowego. Na rysunku 5.7 przedstawiono wyznaczone eksperymentalnie zmiany wartości stężeń octanu winylu w postaci zależności  $S_l/S_{l0} = f(t)$ .

Jak można zauważyć na rys.5.7, po dodaniu do biostatu określonej porcji octanu winylu obserwuje się wyraźny ubytek substratu, któremu nie towarzyszy wzrost stężenia biomasy. Jest to stosunkowo krótki przedział czasu, wynoszący  $\sim 0,33$  godziny. Dla sprawdzenia, czy jest to cecha badanego układu przeprowadzono serię doświadczeń przy takich jak w badaniach kinetycznych parametrach lecz z nieaktywnymi komórkami bakteryjnymi. Eksperyment przeprowadzono dla dwóch wartości stężeń octanu winylu:  $185,4 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$  i  $123,6 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ . Dla obu testowanych stężeń, po 4 godzinach trwania eksperymentu, nie stwierdzono znaczących zmian w stężeniu substratu w roztworze.



Rys. 5.7. Profile zmian stężenia octanu winylu w czasie pojedynczych hodowli szczepu *P. fluorescens* PCM 2123 w obecności różnych wyjściowych dawek substratu.

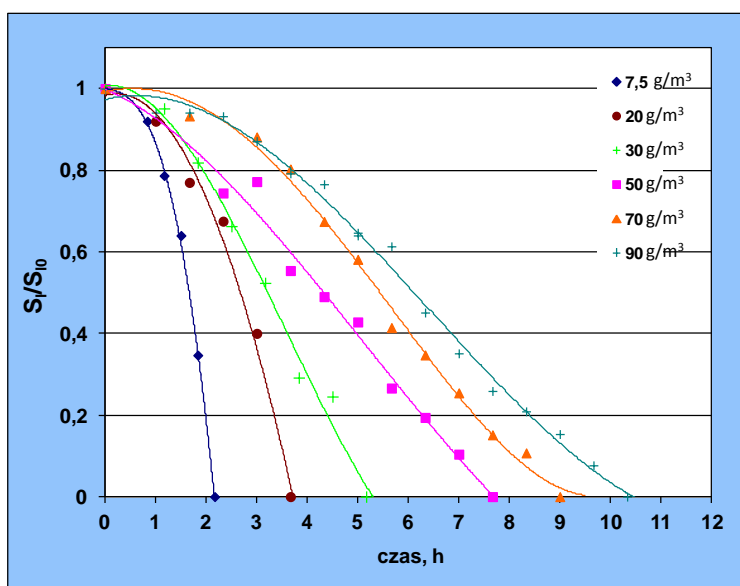
W związku z powyższym dla omawianego układu pomiarowego obserwowany współczynnik wydajności wyznaczano dla okresu hodowli równego okresowi zrównoważonego wzrostu mikroorganizmów. W tym celu dla każdej hodowli sporządzano wykres  $\Delta X_b = f(-\Delta S_l)$  i z pochylenia prostej, którą aproksymowano punkty doświadczalne, odczytywano szukaną wartość  $(Y_{xs})_{obs}$  (rys.5.8)



Rys.5.8. Sposób wyznaczania współczynnika wydajności biomasy  $(Y_{xs})_{obs}$  ( $S_{l0} = 124,6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ ).

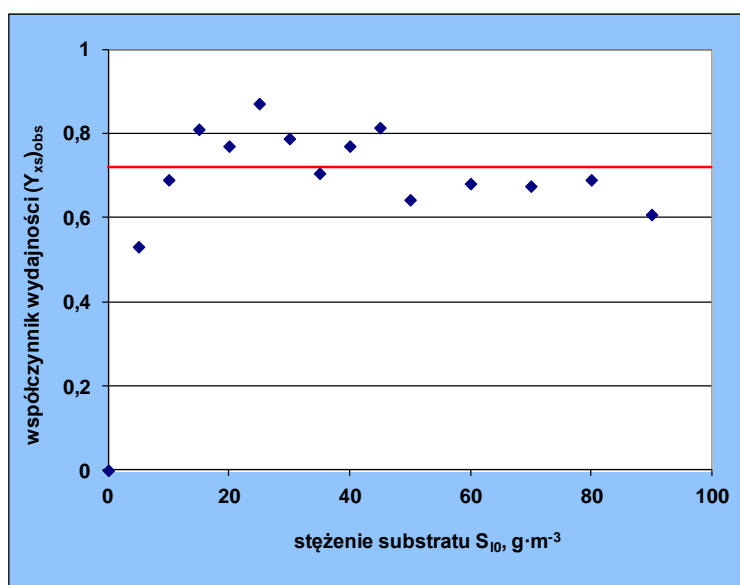
Dla badanego układu współczynnik wydajności biomasy nie zmieniał się znacznie ze zmianą stężenia substratu wzrostowego, a co za tym idzie ze zmianą właściwej szybkości wzrostu. Średnia wartość tego parametru, wyznaczona jako średnia całkowa w rozpatrywanym przedziale zmian stężenia octanu winylu, wynosi  $(Y_{xs})_{obs} = 0,37 \text{ g}_b \cdot \text{g}_s^{-1}$ .

Dla drugiego z badanych lotnych związków organicznych, tj. styrenu, profile zmian stężenia substratu wzrostowego przedstawiono na rys.5.9.



Rys.5.9. Profile zmian stężenia styrenu w czasie hodowli okresowych szczepu *Pseudomonas* sp. E - 93486.

W przypadku tego substratu nie odnotowano zmian jego stężenia w czasie lagfazy, i praktycznie cała dawka styrenu, dodana na początku hodowli, zużywana była w fazie wzrostu wykładniczego. Na rysunku 5.10 zestawiono otrzymane wartości  $(Y_{xs})_{obs}$ . Średnia wartość tego parametru, wyznaczona jako średnia całkowita w rozpatrywanym przedziale zmian stężenia styrenu, wynosi  $(Y_{xs})_{obs} = 0,72 \text{ g}_b \cdot \text{g}_s^{-1}$ .



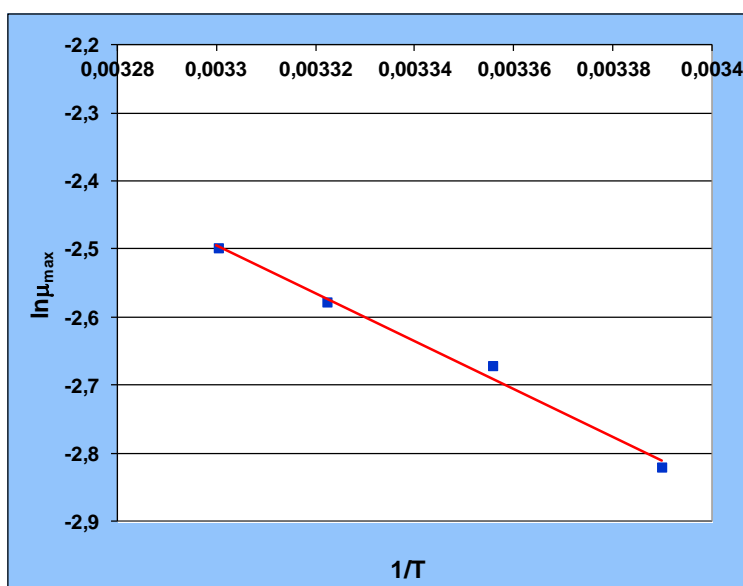
Rys.5.10. Współczynnik wydajności biomasy dla różnych początkowych stężeń styrenu (czerwoną linią zaznaczono średnią wartość  $(Y_{xs})_{obs}$ ).

#### 5.4. Wpływ temperatury na szybkość wzrostu mikroorganizmów

Jednym z parametrów mających wpływ na przebieg procesów z udziałem mikroorganizmów jest temperatura. Wszystkie reakcje mikrobiologiczne to reakcje enzymatyczne, a dla większości enzymów optymalna temperatura ich aktywności mieści się między 20 a 45°C. Stąd w większości prac poświęconych mikrobiologicznemu rozkładowi organicznych zanieczyszczeń wskazuje się temperaturę 25–30°C jako optymalną dla przebiegu procesu (Bandyopadhyay i wsp. (1998), Jung i wsp. (2005)). Jeśli dla opisu szybkości wzrostu mikroorganizmów można zastosować model Monoda, wówczas parametrem zależnym od temperatury jest maksymalna szybkość wzrostu, a zatem:

$$\mu_{max} = A \cdot \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad 5.15$$

gdzie E to energia aktywacji reakcji, niezależna od temperatury bądź stężenia. Nie jest jednoznacznie ujęty wpływ temperatury na stałą półnasylenia  $K_S$  w tym modelu. Najczęściej jednak, wyznaczając wpływ zmian temperatury na szybkość wzrostu biomasy zakłada się, iż stała półnasylenia jest niezależna od tego parametru (Wang i wsp. (1996), Jahan i wsp. (2008), Paślawski i wsp. (2009)). Sytuacja jest bardziej złożona jeśli szybkość wzrostu mikroorganizmów jest opisana równaniem Haldane, gdyż w tym przypadku wszystkie parametry modelu są funkcją temperatury. Z tego względu zależność szybkości wzrostu biomasy od temperatury wyznaczono jedynie dla procesu wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 na styrenie, który z zadowalającą dokładnością, opisać można równaniem Monoda.



Rys.5.11. Wykres zależności wykresu  $\ln\mu_{max} = f\left(\frac{1}{T}\right)$ .

Eksperymenty prowadzono dla początkowego stężenia styrenu równego  $20 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ , zmieniając jedynie temperaturę układu w granicach  $22 - 32^\circ\text{C}$ . Dla każdej hodowli sporządzano wykres  $\ln X_b = f(t)$ , z którego odczytano następnie wartość  $\mu_{max}$ . Uzyskano w ten sposób bazę danych  $\mu_{max}=f(T)$ , którą wykorzystano do sporządzenia wykresu  $\ln\mu_{max} = f\left(\frac{1}{T}\right)$  (rys.5.11). Punkty eksperymentalne aproksymowano linią prostą. Dla zakresu temperatur  $22-30^\circ\text{C}$  otrzymano następujące wartości parametrów równania Arrheniusa:

$$E = 29,249 \text{ k J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$$

$$A = 9100,64 \text{ h}^{-1}$$

Stosunkowo mała wartość energii aktywacji reakcji wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 w obecności styrenu wskazuje, iż w badanym zakresie zmian temperatury reakcja nie jest wrażliwa na te zmiany.

## 6. WYZNACZENIE PARAMETRÓW PRZEMIANY PODSTAWOWEJ

Obserwowany współczynnik wydajności  $(Y_{xs})_{obs}$  nie jest wielkością stałą, ponieważ substrat zużywany jest nie tylko na wzrost biomasy, ale również na produkcję energii, niezbędnej dla procesów podtrzymujących funkcje życiowe mikroorganizmów (ang. cellular maintenance, maintenance energy).

W modelu Pirta (1965) założono, że na podtrzymanie funkcji życiowych mikroorganizmów, nie związanych ze wzrostem, zużywana jest część substratu. Szybkość asymilacji substratu wprowadzanego do hodowli opisano więc zależnością:

$$-\frac{dS_l}{dt} = \frac{1}{(Y_{xs})_{max}} (r_x)_{net} + m_e X_b \quad 6.1$$

gdzie „ $m_e$ ” to współczynnik przemiany podstawowej (ang. maintenance coefficient), uwzględniający wszystkie, oprócz wzrostu, funkcje mikroorganizmów. Według oryginalnej definicji „ $m_e$ ” ma stałą wartość.

W eksperymentach prowadzonych w reaktorach zbiornikowych (periodycznych bądź przepływowych) wyznaczana jest, zdefiniowana przez Monoda, wartość obserwowanego współczynnika wydajności:

$$(Y_{xs})_{obs} = \frac{r_x}{r_s} \quad 6.2$$

Zgodnie z teorią Pirta,  $r_x = (r_x)_g = \mu_g X$ , a  $(r_s)$  opisane jest zależnością (6.1). Podstawiając te zależności do równania (6.2) otrzymano:

$$\frac{1}{(Y_{xs})_{obs}} = \frac{1}{(Y_{xs})_{max}} + \frac{m_e}{\mu_g} \quad 6.3$$

Zależność (6.3) wskazuje, że jeśli prawdziwe jest założenie, iż  $(Y_{xs})_{max}$  i  $m_e$  są wielkościami stałymi, to  $(Y_{xs})_{obs}$  zmienia się wraz ze zmianą właściwej szybkości wzrostu.

Równanie (6.3) wykorzystane zostanie do wyznaczenia wartości maksymalnego współczynnika wydajności i współczynnika przemiany podstawowej  $m_e$ .

Aby wyznaczyć potrzeby badanych mikroorganizmów związane z przemianą podstawową, konieczne jest przeprowadzenie serii hodowli w idealnym reaktorze zbiornikowym przepływowym (CFSTB, ang. continuous-flow stirred tank bioreactor).

Zakładając idealne wymieszanie w całej objętości reaktora, bilans masowy „i” tego składnika mieszaniny reakcyjnej ma postać (Ledakowicz (2011)):

$$\frac{d(C_i V_r)}{dt} = V_0^* C_{i0} - V^* C_i \pm r_i V_r \quad 6.4$$

Ponieważ  $V_0^* = V^*$ , zatem stała jest również objętość płynu w chemostacie ( $V_r = \text{const}$ ). Po odpowiednim czasie układ osiąga stan ustalony a równanie bilansowe przyjmuje postać:

$$D(C_{i0} - C_i) \pm r_i = 0 \quad 6.5$$

gdzie  $D = \frac{V_0^*}{V_r}$  to szybkość rozcieńczania,  $D \text{ h}^{-1}$  (ang. dilution rate)

Zgodnie z powyższym równaniem, bilans wzrostu biomasy w chemostacie ma postać:

$$D(X_{b0} - X_b) + \mu_{net} X_b = 0 \quad 6.6$$

Ponieważ mieszanka dostarczana do chemostatu jest sterylna, zatem  $X_{b0} = 0$  i równanie (6.6) upraszcza się do:

$$D = \mu_{net} \quad 6.7$$

co oznacza, że komórki są usuwane z chemostatu z szybkością równą szybkości ich wzrostu.

Bilans masowy substratu wzrostowego w stanie ustalonym, uwzględniając zależność (6.1), ma postać:

$$V_0^*(S_{l0} - S_l) - V_r \left( \frac{1}{(Y_{xs})_{max}} (r_x)_{net} + m_e X_b \right) = 0 \quad 6.8$$

Podstawiając  $(r_x)_{net} = \mu_{net} X_b$ , a następnie  $D$  w miejsce  $\mu_{net}$  (równanie 6.7), otrzymuje się:

$$\frac{S_{l0} - S_l}{X_b} = \frac{1}{(Y_{xs})_{max}} + \frac{m_e}{D} \quad 6.9$$

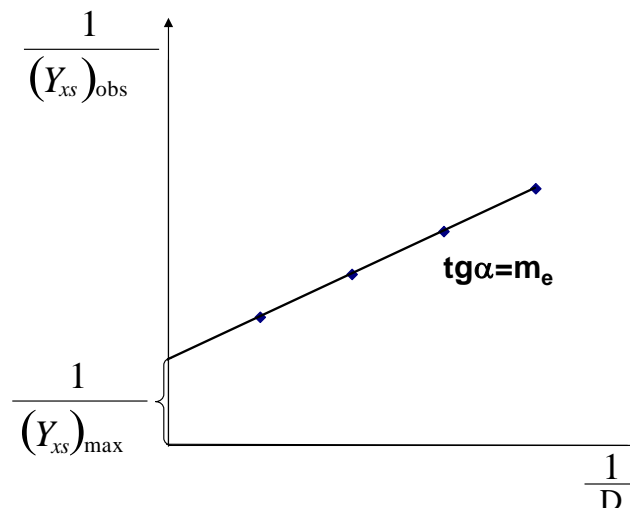
ale

$$\frac{S_{l0} - S_l}{X_b} = \frac{1}{(Y_{xs})_{obs}} \quad 6.10$$

Ostatecznie więc zależność (6.9) przybiera postać:

$$\frac{1}{(Y_{xs})_{obs}} = \frac{1}{(Y_{xs})_{max}} + \frac{m_e}{D} \quad 6.11$$

Wykonując serię eksperymentów w bioreaktorze przepływowym (chemostacie), pracującym w stanie ustalonym przy  $S_0 = \text{const}$ , lecz różnych szybkościach rozcieńczania, i wyznaczając dla każdego eksperymentu odpowiadającą mu wartość  $(Y_{xs})_{obs}$ , otrzymuje się zbiór danych, umożliwiający sporządzenie wykresu  $\frac{1}{(Y_{xs})_{obs}} = f\left(\frac{1}{D}\right)$ . Zgodnie z zależnością (6.11) z wykresu tego odczytać można wartości  $(Y_{xs})_{max}$  i  $m_e$  (rys.6.1).

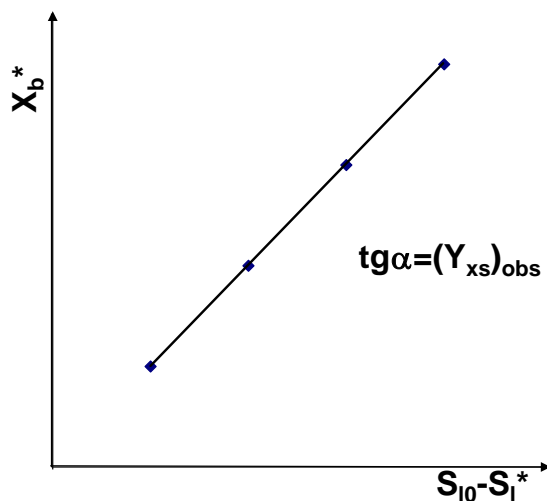


Rys.6.1. Ilustracja sposobu wyznaczenia wartości  $(Y_{xs})_{max}$  i  $m_e$ .

Z kolei wykonując serię eksperymentów przy takiej samej szybkości rozcieńczania ( $D = \text{const}$ ), ale różnym stężeniu substratu wzrostowego w pożywce zasilającej chemostat ( $S_{l0}$ ),



sporządzając wykres  $X_b^* = f(S_{I0} - S_L^*)$ , gdzie \* oznaczono stężenia biomasy i substratu w stanie ustalonym, wyznaczyć można wartość obserwowanego współczynnika wydajności (rys.6.2).

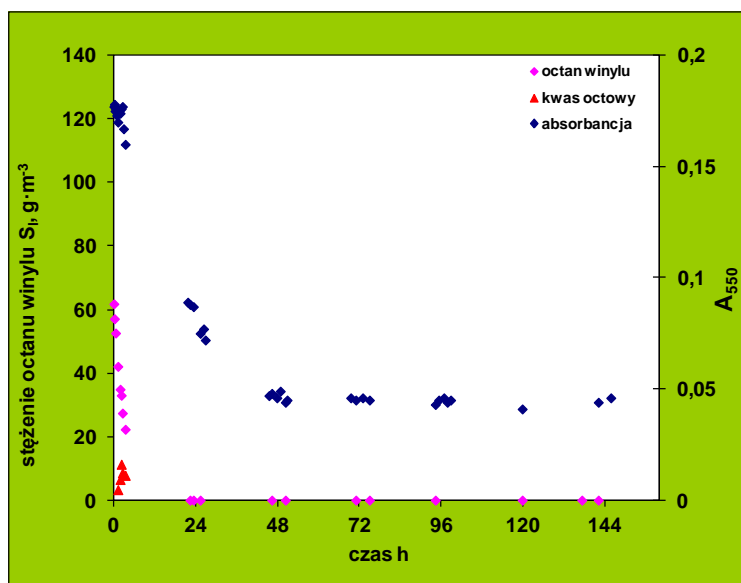


Rys.6.2. Ilustracja sposobu wyznaczenia wartości  $(Y_{xs})_{\text{obs}}$ .

Każdą hodowlę ciągłą rozpoczynano jako hodowlę okresową i dopiero po osiągnięciu fazy wzrostu logarytmicznego zaczynano dozować sterylną pożywkę, zawierającą określoną dawkę substratu wzrostowego, i z taką samą prędkością usuwać z reaktora płyn hodowlany. Każda hodowla ciągła, po osiągnięciu stanu ustalonego (zmiany stężenia substratu i biomasy nie przekraczające 3% w kolejnych analizach), utrzymywana była co najmniej przez czas niezbędny do siedmiokrotnej wymiany fazy ciekłej w chemostacie. W trakcie hodowli, metodami opisanymi w rozdziale 5, oznaczano stężenia biomasy i substratu limitującego wzrost.

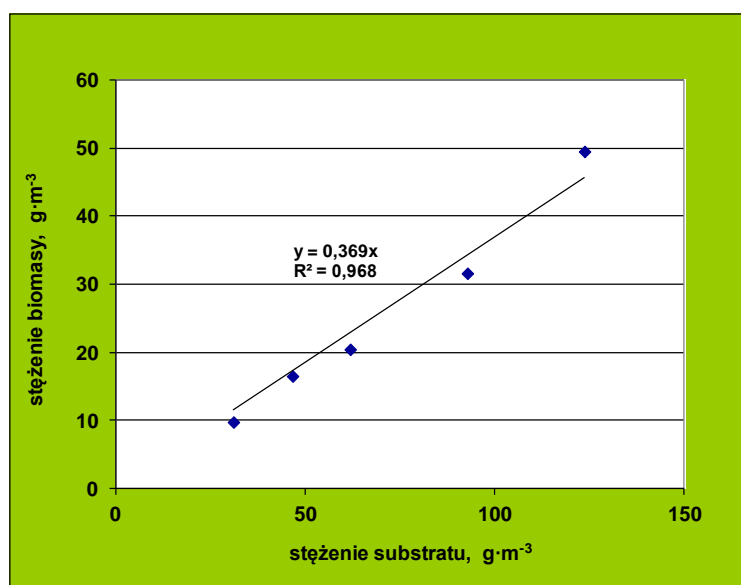
### 6.1. Parametry kinetyczne hodowli ciągłej

Dla wyznaczenia wartości  $(Y_{xs})_{\text{obs}}$  procesu wzrostu szczepu *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 na octanie winylu przeprowadzono serię doświadczeń dla szybkości rozcieńczania  $D = 0,072 \text{ h}^{-1}$ , zmieniając w kolejnych hodowlach stężenie substratu w pożywce dostarczanej do reaktora w granicach  $15 - 123,6 \text{ gm}^{-3}$ . Należy podkreślić, że pomiary były bardzo trudne do przeprowadzenia z powodu odkładania się biofilmu na elementach wyposażenia chemostatu. Na rysunku 6.3 pokazano przebieg zmian stężenia biomasy i octanu winylu w trakcie jednej z kilku hodowli ciągłych.



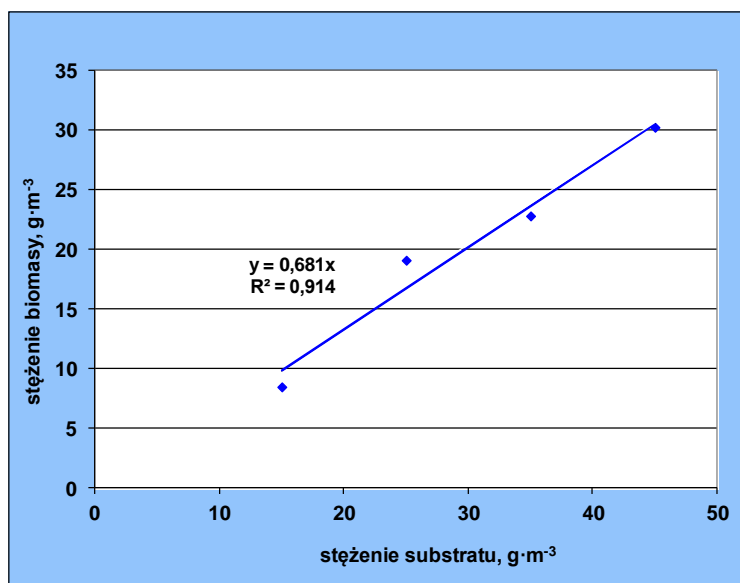
Rys.6.3. Zmiany stężenia biomasy i octanu winylu w trakcie hodowli ciągłej szczepu *P. fluorescens* PCM 2123 prowadzonych przy szybkości rozcieńczania  $D= 0,072 \text{ h}^{-1}$  i  $S_{10}=123,6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ .

Dla każdej hodowli ciągłej określano stężenie biomasy i ilość wykorzystywanego substratu w stanie ustalonym, a w oparciu o wyniki tych hodowli sporządzono wykresy  $X_b^* = f(S_{10} - S_L^*)$  (rys.6.4). Współczynnik kierunkowy prostej, aproksymującej eksperymentalne dane, określa szukaną wartość  $(Y_{xs})_{obs}$ .



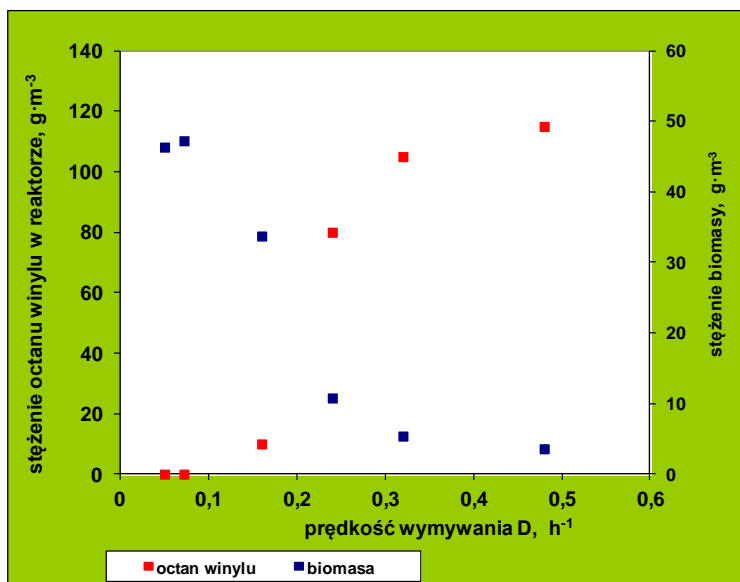
Rys.6.4. Wykres zależności  $X_b^* = f(S_{10} - S_L^*)$  dla różnych stężeń octanu winylu w pożywce zasilającej reaktor  $D= 0,072 \text{ h}^{-1}$ .

Stosując identyczną procedurę wyznaczono wartość  $(Y_{xs})_{obs}$  dla procesu wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 na styrenie, otrzymując wartość  $(Y_{xs})_{obs} = 0,681 \text{ g}_b \cdot \text{g}_s^{-1}$  (rys.6.5)



Rys.6.5. Wykres zależności  $X_b^* = f(S_{10} - S_l^*)$  dla różnych stężeń styrenu w pożywce zasilającej reaktor  $D=0,072 \text{ h}^{-1}$ .

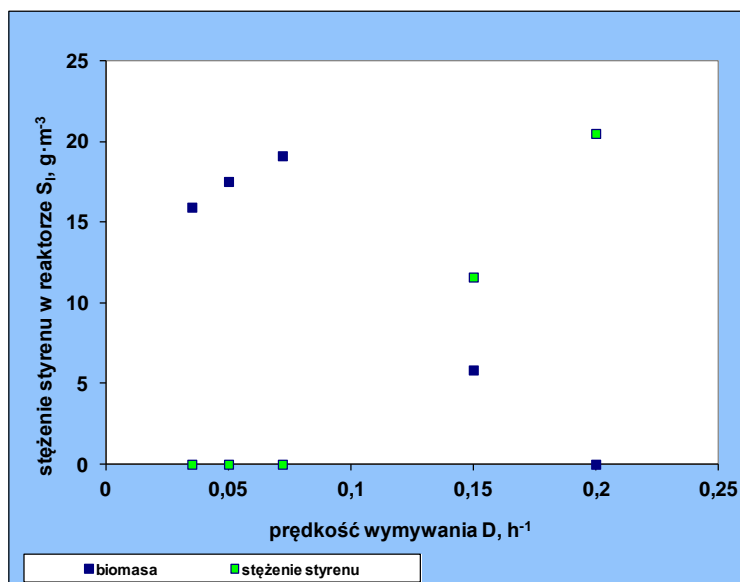
Kolejną serię doświadczeń wykonano utrzymując stałe stężenie octanu winylu w strumieniu zasilającym chemostat ( $123,6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ ), natomiast zmieniano szybkość rozcieńczania reaktora  $D$ . Niestety, z powodu intensywnego obrastania powierzchni elementów wyposażenia reaktora biofilmem, nawet dla bardzo dużych szybkości rozcieńczania ( $D=0,48$ ) nie udało się osiągnąć punktu wymywania biomasy (ang. wash – out) (rys.6.6).



Rys.6.6. Zmiany stężenia biomasy szczepu *P. fluorescens* PCM 2123 i substratu wzrostowego w reaktorze przy różnej szybkości rozcieńczania.  $S_{10} = 123,6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ .

Korzystając z wyników tych eksperymentów, dla wyselekcjonowanych punktów wyznaczono wartości współczynnika przemiany podstawowej  $m_e=0,0251 \text{ g}_{\text{ow}} \cdot \text{g}_{\text{s.m.}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  oraz maksymalnego współczynnika wydajności  $(Y_{xs})_{\text{max}}=0,4633$ .

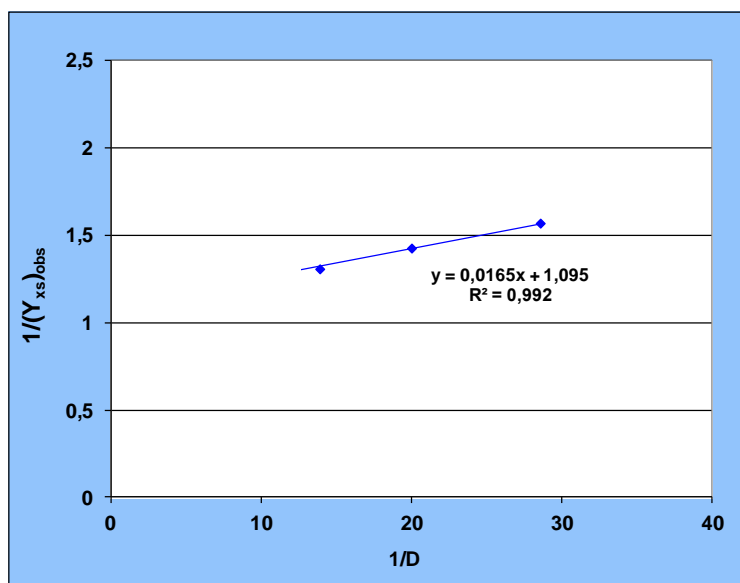
W hodowlach szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 stężenie styrenu w pożywce mineralnej zasilającej reaktor utrzymywano na poziomie  $25 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ , natomiast zmieniano prędkość jej dozowania ( 0,035; 0,05; 0,072; 0,15 i 0,2  $\text{h}^{-1}$ ) (rys.6.7).



Rys.6.7 Zmiany stężenia biomasy i styrenu w reaktorze przy różnej szybkości rozcieńczenia.  $S_{I0} = 25 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ .

Zgodnie z przedstawioną powyżej procedurą, dla hodowli ciągłych, prowadzonych przy  $D= 0,035; 0,05; 0,072$  i  $0,1 \text{ h}^{-1}$  wyznaczano wartości  $(Y_{xs})_{\text{obs}}$ , które w formie zależności

$\frac{1}{(Y_{xs})_{\text{obs}}} = f(1/D)$  przedstawiono na rys.6.8.



Rys.6.8. Wykres zależności  $1/Y_{XS\text{ obs}} = f(1/D)$  dla  $S_I = 25 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$ .

Wyznaczono w ten sposób wartości współczynnika przemiany podstawowej ( $m_e=0,0165 \text{ h}^{-1}$ ) oraz maksymalnego współczynnika wydajności  $(Y_{xs})_{max}=0,913$  dla procesu wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 na styrenie.

Dla wyznaczenia maksymalnej wartości właściwej szybkości wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 na styrenie wykorzystano metodę, zaproponowaną przez Pirta i Calowa, przedstawioną w pracy Esenera i wsp. (1981).

Hodowlę ciągłą prowadzi się przy szybkości rozcieńczania  $D$  mniejszej niż przewidywana, maksymalna wartość właściwej szybkości wzrostu, a po uzyskaniu stanu stacjonarnego zwiększa się wartość  $D$  tak, aby  $D+\Delta D > \mu_{max}$ . Z bilansu biomasy w chemostacie, po scałkowaniu, otrzymuje się zależność:

$$\ln X_b = (\mu_{max} - D)t + \ln X_{b0} \quad 6.12$$

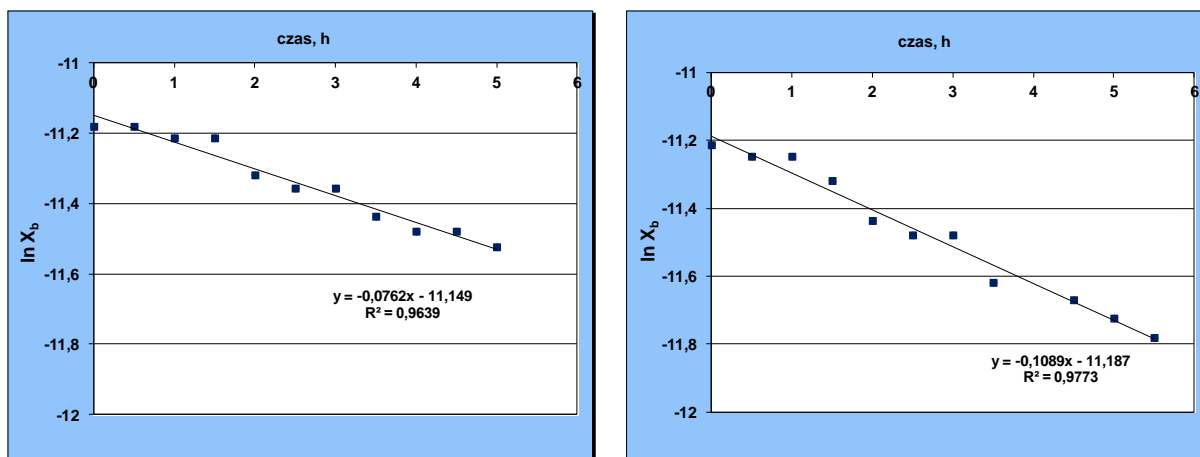
gdzie  $X_{b0}$  to początkowe stężenie biomasy (w momencie zwiększenia wartości szybkości rozcieńczania). Wykres zależności  $\ln\left(\frac{X_b}{X_{b0}}\right) = f(t)$  jest więc prostą, z której współczynnika kierunkowego obliczyć można szukaną wartość maksymalnej właściwej szybkości wzrostu.

Założono więc hodowlę szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 w chemostacie zasilanym pożywką mineralną zawierającą  $25 \text{ g} \cdot \text{m}^{-3}$  styrenu i przez 4 dni utrzymywano stan ustalony przy prędkości rozcieńczania  $D=0,072 \text{ h}^{-1}$ . Stan ten zaburzono w kolejnym dniu, zwiększając prędkość rozcieńczania do  $D=0,184 \text{ h}^{-1}$ . W ciągu 6 godzin absorbancja zawiesiny spadła z 0,028 do 0,017. Po tym czasie wrócono do pierwotnej prędkości rozcieńczania. Po uzyskaniu stanu ustalonego hodowli ponownie zmieniono prędkość rozcieńczania do  $D=0,212 \text{ h}^{-1}$ . Zmiany stężenia biomasy w czasie, gdy pożywkę dozowano ze zwiększoną szybkością przedstawiono na rys.6.9 zaś w tabeli 6.1 zestawiono wyliczone wartości maksymalnej właściwej szybkości wzrostu.

Tabela 6.1 . Zestawienie wartości  $\mu_{max}$  wyznaczonych w hodowlach ciągłych.

$D, \text{ h}^{-1}$	$\mu_{max}, \text{ h}^{-1}$
0,072/0,184	<b>0,1078</b>
0,072/0,212	<b>0,1031</b>

Otrzymane wartości są wyższe od wyznaczonej w hodowli okresowej ( $\mu_{max} = 0,082 \text{ h}^{-1}$ ) ale znacznie bliższe tej wartości niż wyznaczone z pomiarów punktu wymywania biomasy.



Rys. 6.9. Przykłady sposobu wyznaczania maksymalnej szybkości wzrostu mikroorganizmów. Szczep *Pseudomonas* sp. E-93486 rosnący w obecności styrenu.  
a-  $D = 0,072/0,184 \text{ h}^{-1}$  i b -  $D = 0,072/0,212 \text{ h}^{-1}$ .

W tabeli 6.2 porównano wartości  $(Y_{xs})_{obs}$  wyznaczone w trakcie badań z wartościami tego współczynnika wyliczonymi z równań 6.1 i 6.2. Zarówno dla styrenu jak i dla octanu winylu różnice pomiędzy wyznaczonymi doświadczalnie a wyliczonymi z zaproponowanych równań współczynnikami wydajności nie przekraczają 10%.

Tabela 6.2 Porównanie wartości  $(Y_{xs})_{obs}$  wyznaczonych w trakcie badań z wartościami wyliczonymi.

substrat	$D \text{ h}^{-1}$	$(Y_{xs})_{obs}$ - wynik pomiarów	$(Y_{xs})_{obs}$ - wyliczone z równania 6.1 lub 6.2
styren	0,072	0,681	0,755
octan winylu	0,072	0,369	0,399

## 6.2. Weryfikacja opracowanych modeli kinetycznych

Dysponując wyznaczonymi eksperymentalnie krzywymi wzrostu biomasy oraz ubytku substratu wzrostowego można zweryfikować opracowane modele kinetyczne.

Aby otrzymać obliczeniowe profile zmian stężenia biomasy i styrenu w trakcie hodowli okresowej należy rozwiązać układ równań różniczkowych:

$$\frac{dX_b}{dt} = \left( \frac{\mu_{max} S_l X_b}{K_s + S_l + \frac{S_l^2}{K_i}} \right) \left( 1 - \exp\left(-\frac{t}{t_l}\right) \right) \quad 6.13$$

$$-\frac{dS_l}{dt} = \frac{1}{(Y_{xs})_{max}} \left( \frac{dX_b}{dt} \right) + m_e X_b \quad 6.14$$

w którym ostatni człon po prawej stronie zależności 6.13 uwzględnia istnienie fazy adaptacji o czasie trwania  $t_l$  (Ledakowicz (2011)).

Podstawiając wyznaczone w niniejszej pracy wartości parametrów powyższego układu równań otrzymano:

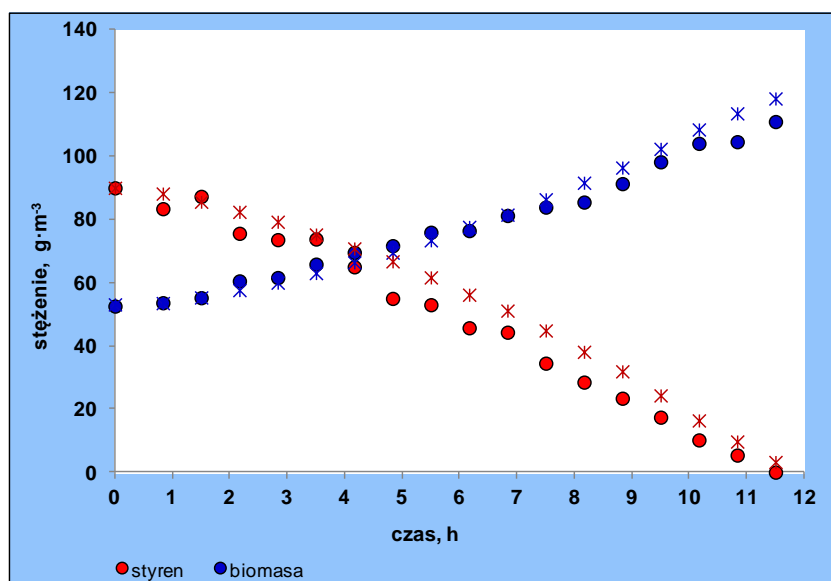
$$\frac{dX_b}{dt} = \left( \frac{0,1029S_l X_b}{3,514 + S_l + \frac{S_l^2}{265,26}} \right) \left( 1 - \exp\left(-\frac{t}{t_l}\right) \right) \quad 6.15$$

$$-\frac{dS_l}{dt} = \frac{1}{0,913} \left( \frac{dX_b}{dt} \right) + 0,0165X_b \quad 6.16$$

Układ równań (6.15-6.16), przy warunku początkowym:

$$\text{gdy } t = 0 \text{ wówczas } X_b = X_{b0} \text{ i } S_l = S_{l0} \quad 6.17$$

rozwiązano metodą Rungego-Kutty 4 rzędu, wykorzystując program, napisany w języku Turbo-Pascal. Na rys.6.10, dla przykładu, porównano eksperymentalne i obliczone z zależności 6.15 i 6.16 profile zmian stężenia biomasy i styrenu w czasie, dla wartości początkowych stężenia substratu wzrostowego równego  $S_{l0}=90 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$



Rys.6.10. Profile zmian stężenia biomasy i styrenu dla stężenia początkowego substratu  $S_{l0}=90 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ , ● - punkty doświadczalne; \* - dane obliczeniowe

Dla wszystkich punktów eksperymentalnych, w całym zakresie zmian stężenia styrenu, uzyskano satysfakcjonującą zgodność danych obliczeniowych i eksperymentalnych.

Ponieważ w badaniach procesu biodegradacji octanu winylu przez szczep *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123, obserwowano ubytek substratu nie tylko w fazie wzrostu wykładniczego, zatem zmodyfikowano sposób weryfikacji opracowanych równań

kinetycznych. W pierwszej kolejności, z danych eksperymentalnych określano stężenie substratu po fazie zastoju, wielkość tę oznaczono symbolem  $S_l^L$

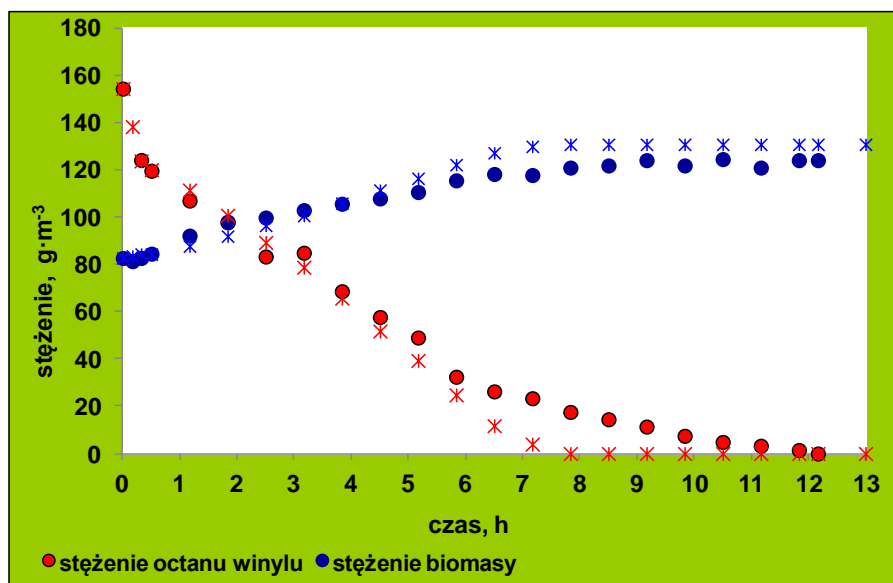
Następnie z układu równań :

$$\frac{dX_b}{dt} = \left( \frac{0,1202S_lX_b}{17,195 + S_l + \frac{S_l^2}{166,88}} \right) \quad 6.18$$

$$-\frac{dS_l}{dt} = \frac{1}{0,463} \left( \frac{dX_b}{dt} \right) + 0,02515X_b \quad 6.19$$

obliczano profile stężeń biomasy i substratu wzrostowego rozwiązując powyższy układ metodą Rungego-Kutty 4 rzędu przy warunku początkowym:

$$\text{gdy } t = t_l \text{ wówczas } X_b = X_{b0} \text{ i } S_l = S_l^L \quad 6.20$$



Rys.6.11 Profile zmian stężenia biomasy i octanu winylu dla stężenia początkowego substratu  $S_{l0}=154,5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ . ●● - punkty doświadczalne; \*\* - dane obliczeniowe

Na rysunku 6.11 porównano obliczeniowe i eksperymentalne profile zmian stężenia octanu winylu i biomasy szczepu *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 w czasie hodowli okresowej dla  $S_{l0}=154,5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-3}$ . Można zauważyć, że obliczone z modelu, a więc z intensywności wzrostu biomasy, stężenia octanu winylu w końcowej fazie zrównoważonego wzrostu są niższe od oznaczanych eksperymentalnie. Można sądzić, że gdy kończy się obfitość substratu, wówczas mikroorganizmy wykorzystują zapasy energii zgromadzone w pierwszej fazie hodowli. Stąd oznaczane w eksperymentach stężenie substratu maleje nieco



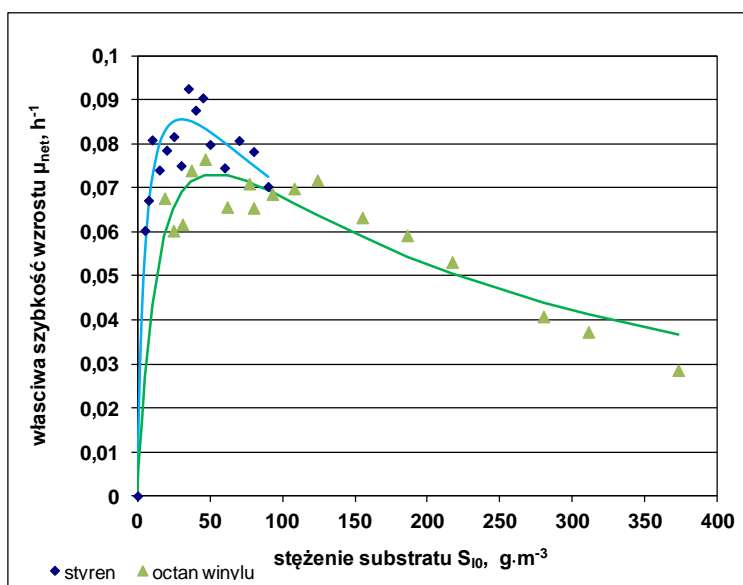
wolniej niż wynikałoby to z opracowanego modelu, a substrat zużywany jest również po zakończeniu fazy wzrostu wykładniczego.

## 7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Wyniki eksperymentów przedstawione w niniejszej rozprawie zamykały pierwszy etap badań nad opracowaniem efektywnej metody oczyszczania powietrza z lotnych związków organicznych w bioreaktorze strużkowym. Był to etap decydujący o efektywności opracowywanej technologii. Od aktywności wybranych szczepów, ich selektywności i odporności na zmieniające się w czasie stężenia zanieczyszczeń zależy bowiem stopień przemiany substratu, a więc stopień oczyszczenia powietrza.

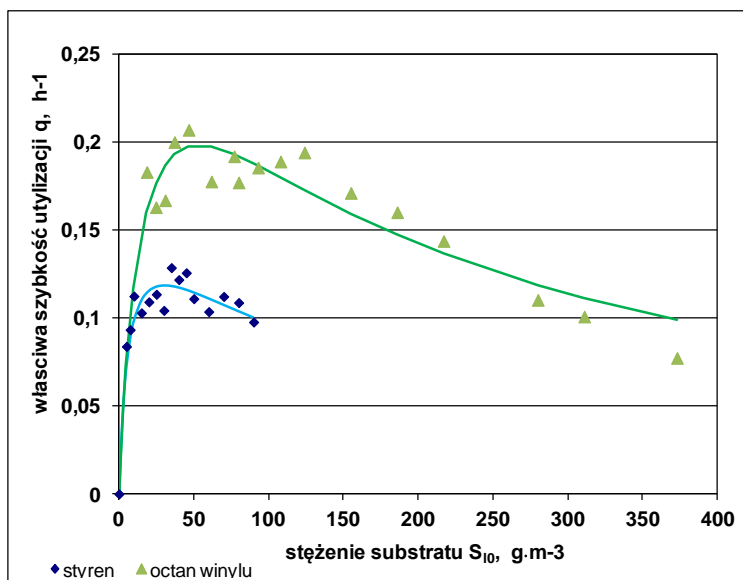
W prezentowanej pracy jako testowe zanieczyszczenia, rozkładane przez wyselekcjonowane mikroorganizmy, wybrano dwa związki z grupy lotnych związków organicznych, różniące się budową chemiczną: są to alifatyczny ester – octan winylu i związek aromatyczny – styren. Różnice w ich budowie chemicznej implikują ich biodegradowalność. Uważa się powszechnie, że estry alifatyczne łatwo ulegają biodegradacji, natomiast związki zawierające pierścień benzenowy są trudniejsze do rozłożenia przez mikroorganizmy bowiem wymagają znacznie większego nakładu energii na rozerwanie pierścienia.

Przedstawione w niniejszej pracy badania wykazały, że wyselekcjonowane mikroorganizmy z porównywalną intensywnością wzrastają na testowanych substratach (rys.7.1). Nie oznacza to oczywiście, że z jednakową szybkością zużywają substrat, będący dla nich jedynym źródłem węgla i energii.



Rys.7.1. Wykres zależności właściwej szybkości wzrostu mikroorganizmów od początkowego stężenia substratu wzrostowego.

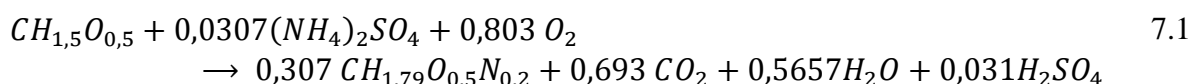
Wyznaczone w pracy wartości współczynników wydajności biomasy w stosunku do ilości przetworzonego substratu wskazują, że w przypadku octanu winylu tylko ~ 37% dostępnego węgla jest transformowane na biomasę, podczas gdy w przypadku styrenu ponad 72%.



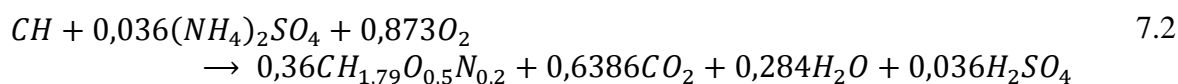
Rys.7.2 Wykres zależności właściwej szybkości biodegradacji substratu od jego stężenia początkowego.

Wyznaczone wartości współczynników wydajności  $(Y_{xs})_{obs}$  umożliwiają również obliczenie wartości współczynników stechiometrycznych równań bilansowych, które przyjmują postać:

- dla wzrostu szczepu *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 na octanie winylu ( $(Y_{xs})_{obs}=0,37$ )



- dla wzrostu szczepu *Pseudomonas* sp. E-93486 na styrenie ( $(Y_{xs})_{obs}=0,72$ )



Równania powyższe umożliwiają oszacowanie zapotrzebowania układu m.in. na azot, a tym samym są kluczowe dla sterowania procesem oczyszczania powietrza w biofiltrach/ bioreaktorach strużkowych. Wyznaczone eksperymentalnie zależności, opisujące szybkość wzrostu badanych mikroorganizmów oraz współczynników, umożliwiających ich transformację na równania opisujące szybkość wykorzystania substratu wzrostowego, umożliwiają ilościowy opis zjawisk zachodzących w bioreaktorze.

W tabeli 7.1 zestawiono wyznaczone w pracy równania opisujące szybkość wzrostu wyselekcjonowanych mikroorganizmów w obecności testowanych substratów oraz parametry przemian podstawowych.

Tabela 7.1 Podstawowe parametry procesów biodegradacji octanu winylu i styrenu odpowiednio przez szczepy *Pseudomonas fluorescens* PCM 2123 oraz *Pseudomonas* sp. E-93486.

	SUBSTRAT	
	OCTAN WINYLU	STYREN
<b>Mikroorganizmy</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PCM 2123	<i>Pseudomonas</i> sp. E-93486
<b>Właściwa szybkość wzrostu biomasy, h<sup>-1</sup></b>	$\mu = \frac{0,1202 \cdot S}{17,195 + S + \left(\frac{S^2}{166,88}\right)}$	$\mu = \frac{0,1029 \cdot S}{3,514 + S + \left(\frac{S^2}{265,27}\right)}$
<b>Obserwowany współczynnik wydajności (hodowla okresowa), g<sub>b</sub>·g<sub>s</sub><sup>-1</sup></b>	0,37	0,72
<b>Obserwowany współczynnik wydajności (hodowla ciągła) eksp / obl</b>	0,369 / 0,399	0,681 / 0,755
<b>Maksymalny współczynnik wydajności</b>	0,463	0,913
<b>Współczynnik przemiany podstawowej, h<sup>-1</sup></b>	0,0251	0,0165
<b>Energia aktywacji reakcji, k J·mol<sup>-1</sup>· K<sup>-1</sup></b>	-	29,25

## 8. OZNACZENIA

symbol	nazwa	jednostka
$\mu_{net}$	właściwa szybkość wzrostu netto	h <sup>-1</sup>
$\mu_g$	właściwa szybkość wzrostu brutto	h <sup>-1</sup>
$\mu_e$	właściwa szybkość przemiany endogennej	h <sup>-1</sup>
$\mu_{max}$	maksymalna właściwa szybkość wzrostu	h <sup>-1</sup>
$\nu$	współczynnik stechiometryczny	
D	szybkość rozcieńczania	h <sup>-1</sup>

$e_Y$	średni błąd procentowy	%
$E$	energia aktywacji	$J \cdot mol^{-1}$
$H^*$	współczynnik podziału substratu (stała Henry'ego)	
$K_s$	stała nasycenia	$g \cdot m^{-3}$
$K_i$	stała inhibicji	$g \cdot m^{-3}$
$M$	masa molowa	$g \cdot mol^{-1}$
$Mc$	masa molowa węglomola	$g \cdot (C - mol)^{-1}$
$m_e$	współczynnik przemiany podstawowej	$h^{-1}$
$m_s$	masa substratu	g
$q_s$	właściwa szybkość utylizacji substratu	$h^{-1}$
$r$	szybkość przemiany	$g \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$
$(r_x)_{net}$	rzeczywista szybkość wzrostu biomasy	$g \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$
$(r_x)_g$	szybkość wzrostu mikroorganizmów brutto	$g \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$
$S$	stężenie substratu	$g \cdot m^{-3}$
$T$	temperatura	K
$t$	czas	h
$t_d$	czas podwojenia	h
$t_l$	czas trwania lagfazy	h
$V$	objętość	$m^3$
$V^*$	natężenie przepływu	$m^3 \cdot h^{-1}$
$X_b$	stężenie biomasy	$g \cdot m^{-3}$
$y_{xs}$	węglomolowy współczynnik wydajności biomasy względem substratu	
$Y_{xs}$	masowy współczynnik wydajności biomasy względem substratu	
$(Y_{xs})_{obs}$	obserwowany współczynnik wydajności	
$(Y_{xs})_{max}$	maksymalna wartość współczynnika wydajności	

indeks	nazwa
0	stan początkowy
S	substrat
N	substrat będący źródłem azotu
X	biomasa
P	produkt
C	CO <sub>2</sub>
W	woda
l	faza ciekła
g	faza gazowa

## 9. LITERATURA

1. Agarry S.E., Solomon B.O.: Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescence*. International Journal of Environment Science and Technology, 5, 223-232 (2008)
2. Arnold M., Riettu A., von Wright A., Martikainen P.J., Suihko M.-L.M.: Bacterial degradation of styrene in waste gases using a peat filter. Appl. Microbiol. Biotechnol., 48, 738-744 (1997)
3. Babae R, Bonakdarpur B., Nasernejad B., Fallah N.: Kinetics of styrene biodegradation in synthetic wastewaters using an industrial activated sludge. J Hazard Mater, 184,111-117 (2010)
4. Bandyopadhyay K., Das D., Maiti B.R.: Kinetics of phenol degradation using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. Bioprocess Engineering,18, 373-377 (1998)
5. Bestetti G., Di Gennaro P., Colmegna A., Ronco I., Galli E., Sello G.: Characterization of styrene catabolic pathway in *Pseudomonas fluorescens* ST. Int. Biodeterior. Biodegrad., 54, 183-187 (2004)
6. Cox H.H.J., Moerman R.E., van Baalen S., van Heiningen W.N.M., Doddema H.J., Harder W.: Performance of a styrene-degrading containing the yeast *Exophiala jeanselmei*. Biotechnol. Bioeng., 53, 259-266 (1997)
7. Deshusses M.A.: Application of immobilized cells for air pollution control in application of cell immobilisation biotechnology. Springer Netherlands, 8B, 507-526 (2005)
8. DYREKTYWA PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY 2010/75/UE z dnia 24 listopada 2010 r. w sprawie emisji przemysłowych.
9. Esener A.A., Roels J.A., Kossen N.W.F., Roozenburg J.W.H.: Description of microbial growth behaviour during the wash-out phase; determination of the maximum specific growth rate. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 13,141-144 (1981)
10. Główny Urząd Statystyczny: Ochrona Środowiska 2010, Warszawa (2010)

11. Greń I., Guzik U., Wojcieszynska D., Łabużek S.; Molekularne podstawy rozkładu ksenobiotycznych związków aromatycznych. *Biotechnologia*, 2 (81), 58-67 (2008)
12. Jahan K., Ordóñez R., Ramachandran R., Balzer Sh., Stern M.: Modeling biodegradation of nonylphenol. *Water Air Soil Pollut: Focus*, 8, 395–404 (2008)
13. Jorio H., Brzeziński R., Heitz M.: A novel procedure for the measurement of the kinetics of styrene biodegradation in a biofilter. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 796-804 (2005)
14. Jung I.-G., Park Ch.-H.: Characteristics of styrene degradation by *Rhodococcus pyridinovorans* isolated from a biofilter. *Chemosphere*, 61, 451-456 (2005)
15. Kennes C., Veiga M.C.: *Bioreactors for waste gas treatment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London 2001
16. Kluska M., Fiszer A., Marciniuk-Kluska A.: Kształtowanie się zawartości styrenu na stanowiskach pracy w stocznjach jachtowych oraz wpływ na zdrowie człowieka., *Bromat. Chem. Toksykol.*, 3, 436-444 (2010)
17. Ledakowicz S. : *Inżynieria biochemiczna WNT*, Warszawa (2011)
18. Moser A.: *Bioprocess Technology. Kinetics and Reactors*. Springer-Verlag New York, (1988)
19. Nieder M., Suwarko B., Meyer O.: Degradation of vinyl acetate by soil, sewage, sludge, and newly isolated aerobic bacterium V2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (10), 3023 - 3028 (1990)
20. O’Leary N.D., O’Connor K.E., Dobson A.D.W.: Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 403-417 (2002)
21. Paślawski J.C., Headley J.V., Hill G.A., Nemati M.: Biodegradation kinetics of trans-4-methyl-1-cyclohexane carboxylic acid. *Biodegradation*, 20, 125–133 (2009)
22. Portal ekoinfo.pl <http://www.ekoinfo.pl/lotne-zwiazki-organiczne-lzo-uniqueidjXNs7lB4Pu1cRBOGrZTdQj6dfRoh3FBB/>
23. Simon P., Filser J.G., Bolt H. M.: Metabolism and pharmacokinetics of vinyl acetate. *Arch.Toxicol.*, 57, 191-195 (1985)
24. Singh R.K., Kumar Sh., Kumar S., Kumar A.: Biodegradation kinetic studies for the removal of p-cresol from wastewater using *Gliomastix indicus* MTCC 3869. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 293–303 (2008)
25. *Styrene Chemical Response Guide*, CEDRE (2004)
26. *Styrene - Report on Carcinogens*, National Toxicology Program, Department of Health and Human Services, Twelfth Edition (2011)

27. Takeuchi M., Weiss N., Schumann P., Yokota A.: *Leucobacter komagatae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic Gram-positive, nonsporulating rod with 2, 4-diaminobutyric acid in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 4, 967–971 (1996)
28. Wang P., Humphrey A.E., Krawiec S.: Kinetics analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in continuous cultures. *App. and Environ. Microbiol.*, 62, 3066-3068 (1996)
29. Warhurst A.M., Clarke K.F., Hill R.A., Holy R.A., Fewson C.A.: Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1137-1145 (1994)
30. WHO: Styrene in Drinking-water. Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*. (2003)
31. WHO: Air Quality Guidelines for Europe, WHO Regional Publications, European Series, No. 91 (2000)
32. Yu Jian-ming, Liu Liang, Cai Wen-ji, Cheng Zhuo-wei, Chen Jian-meng, Jiang Yi-feng: Identification and characteristics of a *Pseudomonas putida* strain with the capable of efficiently degrade styrene. *China Environmental Science*, 34 (6), 1564-1571 (j.chiński) (2014)