

**ZESZYTY  
NAUKOWE  
POLITECHNIKI  
ŚLĄSKIEJ**

**MARTA JANOSZ-RAJCZYK**

**BIODEGRADACJA  
KATIONOWYCH SUBSTANCJI  
POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH**

P.3356/94

**INŻYNIERIA  
ŚRODOWISKA**

**Z. 37**

**GLIWICE  
1994**

# POLITECHNIKA ŚLĄSKA

ZESZYTY NAUKOWE

Nr 1227

P.3356/94



MARTA JANOSZ-RAJCZYK

## BIODEGRADACJA KATIONOWYCH SUBSTANCJI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH

OPINIODAWCY

Dr hab. inż. Krzysztof Bartoszewski — Prof. nadzw. Politechniki Wrocławskiej  
Prof. dr hab. inż. Wiesław Szeja

KOLEGIUM REDAKCYJNE

REDAKTOR NACZELNY — Prof. dr hab. inż. Jan Bandrowski  
REDAKTOR DZIAŁU — Dr inż. Helena Kościelniak  
SEKRETARZ REDAKCJI — Mgr Elżbieta Leško

REDAKCJA

Mgr Roma Łoś

REDAKCJA TECHNICZNA

Alicja Nowacka

Wydano za zgodą  
Rektora Politechniki Śląskiej

PL ISSN 0867-6038

Wydawnictwo Politechniki Śląskiej  
ul. Kujawska 3, 44-100 Gliwice

Naki 150+83 Ark. wyd. 9 Ark. druk. 9,5 Papier offset. kl. III 70x100. 80g  
Oddano do druku 24.01.94 Podpis. do druku 24.01.94 Druk ukończ. w marcu 1994  
Zam. 53/94 Cena zł 32 000,-

Fotokopie, druk i oprawę  
wykonano w Zakładzie Graficznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Errata

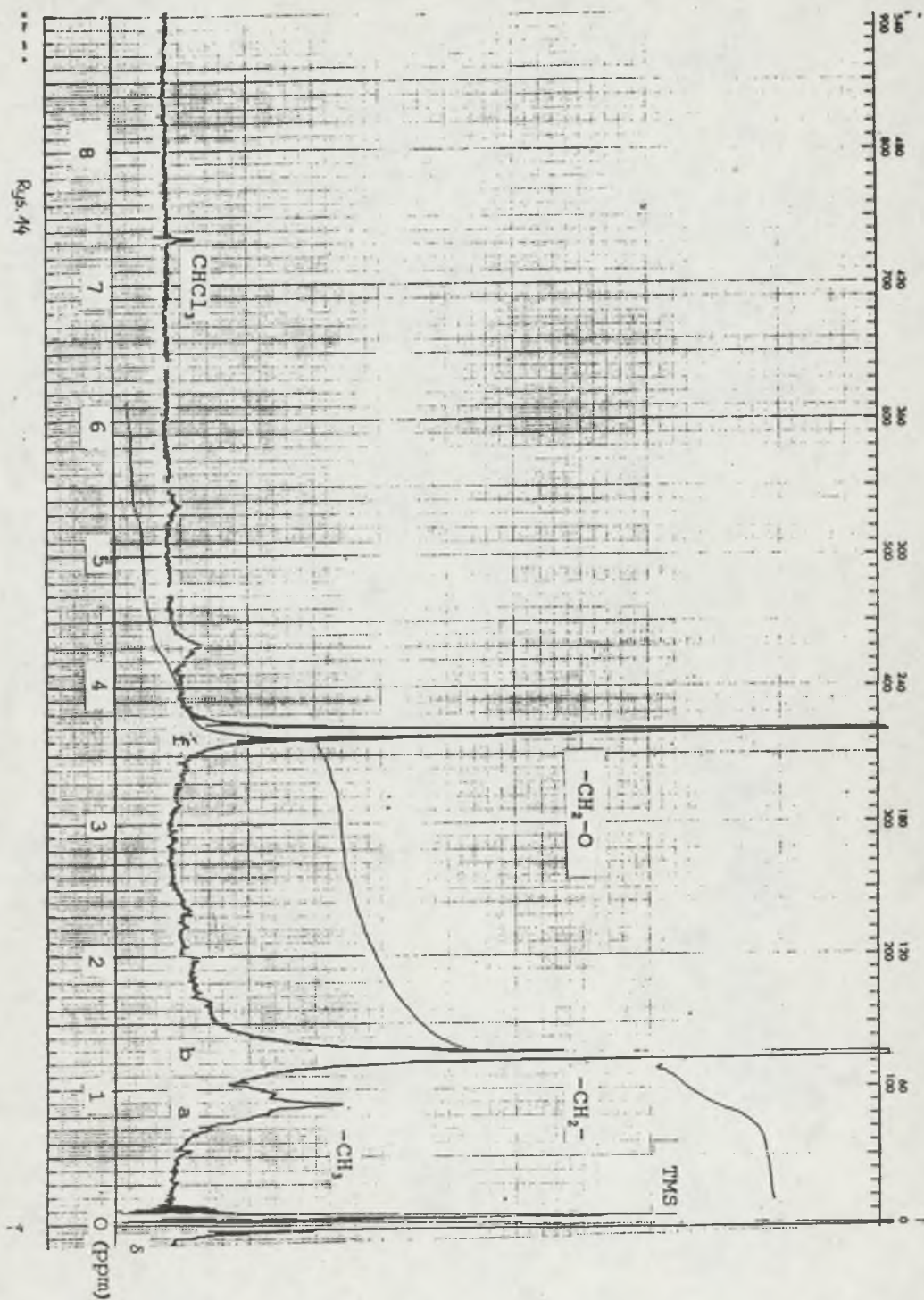
Str.	W. od g.	W. od d.	Rys.	Tab.	Jest	Powinno być
4	-	16	-	-	czynneg	czynnego
19	-	19	-	-	benzylowaj	benzylowej
22	9	-	-	-	spkroskopowe	spektroskopowe
24	8	-	-	-	stężanie	stężenie
25	8	-	-	-	jest z to	jest to z
28	18	-	-	-	zleca	zaleca
28	21	-	-	-	podstawnie	podstawie
29	14	-	-	-	powierzniowo	powierzchniowo
33	-	15	-	-	strali	starali
34	-	15	-	-	obadania	badania
35	-	6	-	-	alkilotrójmetlo- amoniowych	alkilotrójmetylo- amoniowych
36	16	-	-	-	alkilotrójmetlo- amoniowych	alkilotrójmetylo- amoniowych
36	18	-	-	-	alikalowym	alkilowym
36	-	3	-	-	(2-hydroksyetylo)	(2-hydroksyetylo)
37	6	-	-	-	alkiloamoniowego	alkiloamoniowego
38	-	11	-	-	n-alkilotiometyo	n-alkilotiometylo
38	-	16	-	-	hydroksylową	etoksyłową
38	-	16	-	-	hydroksylową	etoksyłową
40	1	-	-	-	badniach	badaniach
41	-	16	-	-	Hellmna	Hellmanna
42	15	-	-	-	utleniania	utlenianie
43	-	18	-	-	rozszczipiające	rozszczipiające
44	1	-	-	-	dwuterminala	dwuterminalna
44	5	-	-	-	powstawnia	powstawania
44	8	-	-	-	obecności	obecności
65	8	-	-	9	100	99
66	-	4	-	-	pokazano	pokazano w
69	3	-	-	-	0.1784	0.6052
73	-	-	7	-		wymienić na inny
75	-	-	9	-		wymienić na inny
76	2	-	-	-	azotem w metylo- aminie	azotem o przesu- nieniu
77	-	9	-	-	Tabela 17	Tabela 16
79	8	-	-	17	100	99
79	-	8	-	18	Kamin R 15 RM	Kaminox R 15 RM
100	1	-	18	-		(b)
100	-	10	18	-		(a)
103	-	-	14	-		wymienić na inny
106	2	-	-	-	wprowadze-	wprowadze-
107	-	10	-	-	nitryfikację	nitryfikację

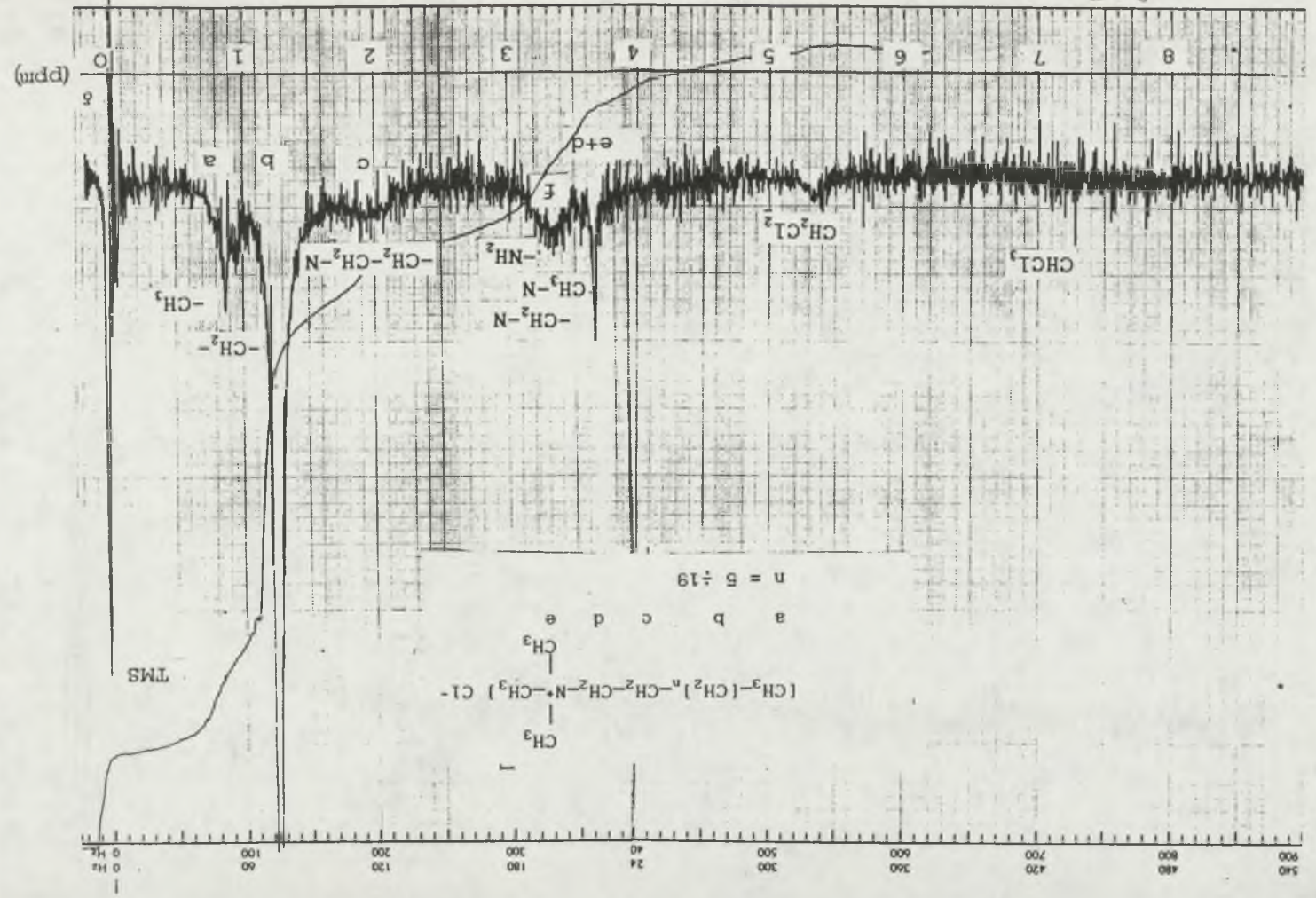
ZN Inżynieria Środowiska z.37



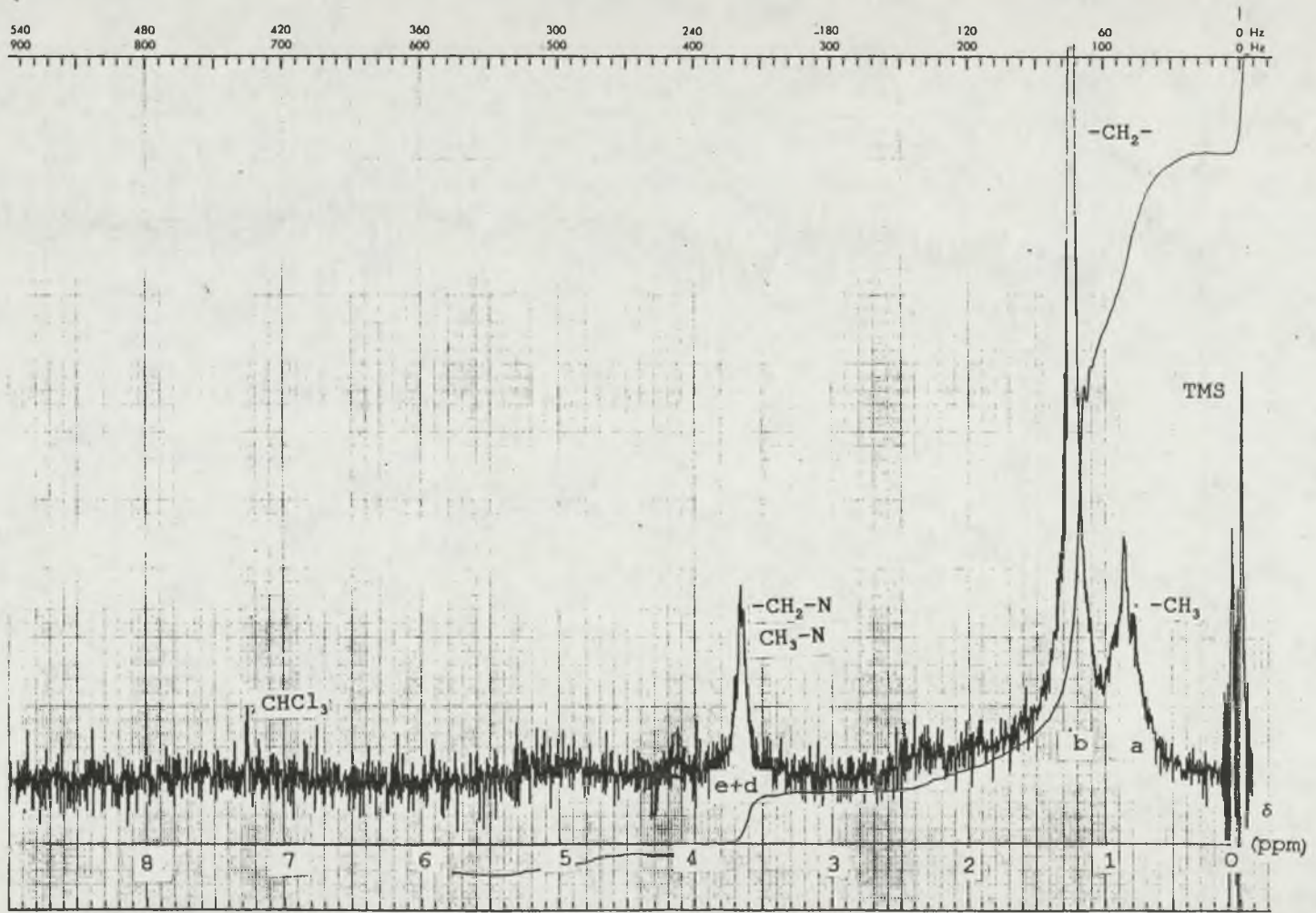
Str.	W. od g.	W. od d.	Rys.	Tab.	Jest	Powinno być
111	1	-	24	-		(b)
111	-	10	24	-		(b)
113	-	13	-	-	$\delta$ :5:7 ppm	$\delta$ :5.7 ppm
113	-	10	-	-	metylenowch	metylenowych
121	-	14	-	-	gromadznia	gromadzenia
122	-	3	-	-	ule-	utle-
124	-	13	-	-	wego	we
124	-	4	-	-	nitryfikację	nitryfikacja
125	6	-	-	-	rozkładu	rozkładem
125	18	-	-	-	RM	MR
126	12	-	-	-	decylodwumetylo-	decylodwumetylo-
					amina	amina
127	8	-	-	-	Kamin R RM	Kamin R MR
128	10	-	-	-	Kamin R RM	Kamin R MR
128	11	-	-	-	metyloamoniwy	metyloamoniowy
128	19	-	-	-	Krzemińskiego	Krzemińskiego
130	-	8	-	-	właściwości	właściwości
133	-	6	-	-	R RM	R MR
134	8	-	-	-	R RM	R MR
134	13	-	-	-	R RM	R MR
134	-	14	-	-	dwumetloamoni-	dwumetyloamoni-
					wego	wego
135	4	-	-	-	sedymentacje	sedymentacyjne
135*	-	1	-	-		
136	4	-	-	-	amo	amo-
136	-	6	-	-	alkloaminy	alkiloaminy
138	8	-	-	-	Diodegradation	Biodegradation
139	11	-	-	-	Spoktroskopie	Spektroskopie
140	-	14	-	-	adaptacje	adaptacyjne
140	-	4	-	-	Detrgants	Detergents
143	15	-	-	-	oczistka	oczistka
143	-	9	-	-	Mikrbiologii	Mikrobiologii
144	11	-	-	-	biodegradacje	biodegradację
145	-	5	-	-	czynnych i	czynnych i

\* usunąć cały wiersz









Rys. 9

OPINIODAWCY  
Dr hab. inż. Krzysztof Bartoszewski — Prof. nadzw. Politechniki Wrocławskiej  
Prof. dr hab. inż. Wiesław Szeja

KOLEGIUM REDAKCYJNE

REDAKTOR NACZELNY — Prof. dr hab. inż. Jan Bandrowski  
REDAKTOR DZIAŁU — Dr inż. Helena Kościelniak  
SEKRETARZ REDAKCJI — Mgr Elżbieta Leśko

REDAKCJA  
Mgr Roma Łoś

REDAKCJA TECHNICZNA  
Alicja Nowacka

Wydano za zgodą  
Rektora Politechniki Śląskiej

PL ISSN 0867-6038

Wydawnictwo Politechniki Śląskiej  
ul. Kujawska 3, 44-100 Gliwice

Nakł. 150+83 Ark. wyd. 9 Ark. druk. 9,5 Papier offset. kl. III 70x100. 80g  
Oddano do druku 24.01.94 Podpis. do druku 24.01.94 Druk ukończ. w marcu 1994  
Zam. 53/94 Cena zł 32 000,—

Fotokopie, druk i oprawę  
wykonano w Zakładzie Graficznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach

SPIS TREŚCI

	str.
WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SYMBOLI I JEDNOSTEK.....	13
1. WSTĘP.....	15
2. CEL PRACY.....	21
3. CZĘŚĆ OPISOWA.....	23
3.1. Wprowadzenie.....	23
3.2. Właściwości fizykochemiczne KSPC.....	23
3.3. Antyseptyczne właściwości KSPC.....	24
3.4. Biodegradacja KSPC.....	26
3.4.1. Wybrane zagadnienia związane z adaptacją drobno- ustrojów i biodegradacją KSPC.....	27
3.4.2. Mikroorganizmy biorące udział w biodegradacji KSPC .....	31
3.4.3. Zastosowanie specjalnych technik pomiarowych w badaniu biodegradacji KSPC.....	32
3.4.4. Czynniki określające biodegradację pierwotną KSPC.....	35
3.4.5. Wpływ struktury KSPC na biodegradację całkowitą .....	40
3.5. Mechanizm procesu biodegradacji SPC.....	41



4. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	48
4.1. Metodyka badań.....	48
4.1.1. Badane substraty i warunki hodowli osadu czynnego.....	48
4.1.2. Oznaczenia analityczne.....	50
4.1.2.1. Oznaczenia fizykochemiczne.....	50
4.1.2.2. Oznaczenie aktywności dehydrogenaz..	51
4.1.2.3. Analiza widmowa IR i <sup>1</sup> H NMR.....	51
4.2. Wyniki doświadczeń.....	52
4.2.1. Biodegradacja bromku cetylotrójmetyloamnio- wego przez drobnoustroje osadu czynnego.....	52
4.2.2. Biodegradacja preparatu Kamin R MR przez drobnoustroje osadu czynnego.....	62
4.2.3. Biodegradacja preparatu Kaminox R 15 RM przez drobnoustroje osadu czynnego.....	76
4.2.4. Biodegradacja preparatu Kaminox R 5 RB przez drobnoustroje osadu czynnego.....	90
4.2.5. Biodegradacja preparatu Kaminox R 11 RB przez drobnoustroje osadu czynnego.....	104
5. Dyskusja wyników .....	119
5.1. Biodegradacja wybranych kationowych substancji po- wierzchniowo czynnych w obecności łatwo utlenialego substratu.....	119
5.2. Utlenianie czwartorzędowego azotu przez drobnoustroje osadu czynnego.....	124
5.3. Wpływ struktury wybranych kationowych substancji powierzchniowo czynnych na biodegradację.....	126
5.4. Mechanizm biodegradacji wybranych kationowych sub- stancji powierzchniowo czynnych przez drobnoustroje osadu czynnego.....	130

6. Wnioski.....	135
-----------------	-----

LITERATURA.....	137
-----------------	-----

STRESZCZENIE.....	147
-------------------	-----



CONTENTS

page

LIST OF MORE IMPORTANT SYMBOLS AND UNITS.....13

1. INTRODUCTION.....15

2. OBJECT OF THE WORK.....21

3. DESCRIPTIVE PART.....23

3.1.Preface.....23

3.2.Physico-chemical properties of CSAA.....23

3.3.Antiseptic properties of CSAA.....24

3.4.CSAA Biodegradation.....26

3.4.1.Selected problems related to the adaptation of microorganisms and the biodegradation of CSAA .....27

3.4.2.Microorganisms that take part in the CSAA biodegradation.....31

3.4.3.Application of special measuring techniques to the examination CSAA biodegradation.....32

3.4.4.Factors determining the primary CSAA biodegradation..... 35

3.4.5.The effect of the CSAA structure on the ultimate biodegradation.....40

3.5.Mechanism of the SAA biodegradation process.....41

4. EXPERIMENTAL PART.....48

4.1. Method of testing.....48

4.1.1.Substrates tested and the condition of activated sludge.....48

4.1.2.Assaying.....50

4.1.2.1.Physico-chemical determinations.....50

4.1.2.2.Determination of the activity of dehydrogenases.....51

4.1.2.3.IR and <sup>1</sup>H NMR spectroanalyses.....51

4.2. Results of experiments.....52

4.2.1.Biodegradation of hexadecyltrimethylammonium bromide by activated sludge microbes.....52

4.2.2.Biodegradation of the preparation Ka-min R MR by activated sludge microbes.....62

4.2.3.Biodegradation of the preparation Kami-nox R 15 RM by activated sludge microbes.....76

4.2.4.Biodegradation of the preparation Kami-nox R 5 RB by activated sludge microbes.....90

4.2.5.Biodegradation of the preparation Kami-nox R 11 RB by activated sludge microbes....104

5. Results of experiments.....119

5.1.Biodegradation of the selected cationic surface-active agents in the presence of a readily oxidizable substrate.....119

5.2.Quaternary nitrogen oxidation by activated sludge microbes.....124

5.3.The effect of the structure of selected cationic surface-active agents on biodegradation.....126

5.4. Mechanism biodegradation of selected cationic surface-active agents by microorganisms of activated sludge.....	130
6. CONCLUSIONS.....	135
LITERATURE.....	137
SYNOPSIS.....	147

СОДЕРЖАНИЕ	
	стр.
ПЕРЕЧЕНЬ ВАЖНЕЙШИХ СИМВОЛОВ И ЕДИНИЦ.....	13
1. ВВЕДЕНИЕ.....	15
2. ЦЕЛЬ РАБОТЫ.....	21
3. ОПИСАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	23
3.1. Введение.....	23
3.2. Физикохимические свойства КПАВ.....	23
3.3. Антисептические свойства КПАВ.....	24
3.4. Биодegradация КПАВ.....	26
3.4.1. Избранные вопросы, связанные с адаптацией микробов и биодegradацией КПАВ.....	27
3.4.2. Микроорганизмы участвующие в биодegradации КПАВ.....	31
3.4.3. Применение специальных измерительных техник при исследовании биодegradации КПАВ.....	32
3.4.4. Факторы определяющие первичную биодegradацию КПАВ.....	35
3.4.5. Влияние структуры КПАВ на полную биодegradацию.....	40
3.5. Механизмы процесса биодegradации ПАВ.....	41



4. ОПЫТНАЯ ЧАСТЬ.....	48
4.1. Методика исследований.....	48
4.1.1. Исследуемые субстраты и условия выращивания активного ила.....	48
4.1.2. Аналитические определения.....	50
4.1.2.1. Физикохимические определения.....	50
4.1.2.2. Определение активности биогидроге- наз.....	51
4.1.2.3. Спектральный анализ с применением ИК- и <sup>1</sup> H ЯМР-спектроскопии.....	51
4.2. Результаты опытов.....	52
4.2.1. Биодegradация цетилтриметиламмониевого бро- мида микробами активного ила.....	52
4.2.2. Биодegradация препарата Kamín R MR микробами активного ила.....	62
4.2.3. Биодegradация препарата Kaminox R 15 RM микробами активного ила.....	76
4.2.4. Биодegradация препарата Kaminox R 15 RB микробами активного ила.....	90
4.2.5. Биодegradация препарата Kaminox R 11 RB микробами активного ила.....	104
5. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	119
5.1. Биодegradация избранных катионных поверхностно-ак- тивных веществ в присутствии легкоокисляющегося субстрата.....	119
5.2. Окисление четвертичного азота микробами активного ила.....	124

5.3. Влияние структуры избранных катионных поверхностно- активных веществ на биодegradацию.....	126
5.4. Механизм биодegradации избранных катионных поверх- ностно-активных веществ микробами активного ила.....	130
6. ВЫВОДЫ.....	135
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137
РЕЗЮМЕ.....	147

### WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SYMBOLI I JEDNOSTEK

- $k$  - stała szybkości dla równania Eckenfeldera,  $m^3/g d$ ,  
 $p$  - przyjęty poziom ufności 95 % ,  
 $ppm$  -bezwymiarowa miara przesunięcia w pomiarach jądrowego rezonansu magnetycznego protonu (wodoru),  
 $r$  -współczynnik korelacji,  
 $sm$  -sucha masa organiczna osadu czynnego,  $g sm/dm^3$ ,  
 $t$  - czas zatrzymania (retencji) w reaktorze, godz.,  
 $z$  -zawartość zawiesiny osadu czynnego w reaktorze,  $g/dm^3$ ,  
 $A_1$  -absorbancja pasm  $-CH_3$  ,  
 $A_2$  -absorbancja pasm  $-CH_2-$  ,  
 $ASPC$  -anionowe substancje powierzchniowo czynne,  
 $A_d$  -aktywność dehydrogenaz,  
 $A_v$  -przyrost aktywności dehydrogenaz w jednostce objętości reaktora,  $\mu M TF/dm^3 h$ ,  
 $A_z$  -przyrost aktywności właściwej dehydrogenaz,  $\mu M TF/g sm h$ ,  
 $IR$  -widmo IR , widmo wykonane w podczerwieni,  
 $HBL$  -symbol równowagi hydrofilowo-lipofilowej cząsteczki  $SPC$ ,  
 $^1H NMR$  - widmo  $^1H NMR$  ,widmo wykonane przy wykorzystaniu jądrowego rezonansu magnetycznego protonu (wodoru),  
 $KSPC$  -kationowe substancje powierzchniowo czynne,  
 $NSPC$  -niejonowe substancje powierzchniowo czynne,  
 $O_v$  -obciążenie substratowe reaktora (szybkość dostarczania substratu),  $g CZT/dm^3 d$ ,

- $O_z$  -obciążenie substratowe osadu czynnego (właściwa szybkość dostarczania substratu),  $g CZT/g sm d$ ,  
 $RWO$  -rozpuszczony węgiel organiczny,  
 $SPC$  -substancje powierzchniowo czynne,  
 $T_1$  -transmisja pasm  $-CH_3$  ,  
 $T_2$  -transmisja pasm  $-CH_2-$  ,  
 $TMS$  -trójmetrylosilan,  
 $V_v$  -szybkość usuwania (zaniku) substratu w reaktorze,  $g CZT/dm^3 d$ ,  
 $V_z$  -właściwa szybkość usuwania (zaniku) substratu w reaktorze,  $g CZT/g sm d$ .



## 1. WSTĘP

Produkowane przez przemysł substancje organiczne mogą dostawać się do środowiska powodując trudne do przewidzenia szkody ekologiczne. Do substancji tych należą również substancje powierzchniowo czynne (SPC). SPC już w niewielkich kilkumiligramowych stężeniach zmieniają cechy organoleptyczne i hamują procesy samooczyszczania wody, w tym również procesy mineralizacji osadów dennych w zbiornikach wodnych [7, 80]. SPC zmieniając właściwości wody na granicy faz, utrudniają wymianę gazową i ograniczają dostęp tlenu do środowiska. Ponadto zwiększają rozpuszczalność węglowodorów w wodzie, w tym również niebezpiecznych dla człowieka wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. W zależności od budowy chemicznej wykazują działanie toksyczne na wybrane organizmy wodne i procesy fizjologiczne [7, 57, 59, 64, 70].

Obecne w ściekach przy wyższych stężeniach substancje powierzchniowo czynne po wprowadzeniu na biologiczną oczyszczalnię mogą przyczyniać się do wynoszenia osadu czynnego z komory napowietrzania lub utrudniać sedymentację zawiesiny w osadniku wstępnym i wtórnym [78]. Poza tym SPC trudno rozkładalne obniżają szybkość biochemicznej degradacji organicznych substratów i hamują proces nitryfikacji azotu amonowego [40].

KSPC w środowisku wodnym posiadające dodatni ładunek łączą się z cząstkami o przeciwnym ładunku lub ulegają kontrakcji z niektórymi substancjami powierzchniowo czynnymi. Są to

cechy charakterystyczne, odróżniające kationowe substancje powierzchniowo czynne od pozostałych SPC.

Kationowe substancje powierzchniowo czynne stanowią tylko niewielki procent wszystkich produkowanych SPC, ale również jak pozostałe mogą stanowić zagrożenie dla naturalnego środowiska, jeżeli nie będą ulegały biochemicznej destrukcji. KSPC wykazują właściwości bakteriobójcze lub hamujące wzrost nie tylko w stosunku do drobnoustrojów patogennych, ale także do mikroorganizmów zasiedlających środowisko naturalne, jeżeli został przekroczony próg toksyczności [74]. Sygnalizuje to, że badania biochemicznej degradacji mogą stwarzać wiele trudności, a uzyskane rezultaty, szczególnie przy prowadzeniu badań dla populacji mieszanych, mogą być trudne do powtórzenia. Zapewne dlatego literatura podaje sprzeczne informacje o możliwościach biodegradacyjnych kationowych substancji powierzchniowo czynnych [6, 48, 59].

Dużo krajów w trosce o ochronę środowiska wprowadziło przepisy zabraniające użytkowania SPC, które nie ulegają biodegradacji w warunkach standardowych. Dlatego też od wielu lat placówki naukowe podejmują badania określające zależność pomiędzy biodegradacją a strukturą SPC. Najczęściej badane były anionowe oraz niejonowe substancje powierzchniowo czynne, gdyż stanowią one zdecydowaną większość produkowanych SPC. Pozostałe, w tym kationowe substancje powierzchniowo czynne, były testowane znacznie rzadziej. Stąd ilość informacji dotyczących biodegradacji KSPC i mechanizmu tego procesu jest stosunkowo niewielka [59].

Dotychczasowe informacje na temat biodegradacji pozwalają sądzić, że jest ona zarówno funkcją właściwości fizykochemicznych, w tym także struktury chemicznej kationowych substancji powierzchniowo czynnych, jak i możliwości degradacyjnych mikroorganizmów, a także warunków środowiskowych [7, 15, 57, 59, 64]. Literatura podaje, że najczęściej badanymi

KSPC były czwartorzędowe sole amoniowe, a wśród nich przede wszystkim sole alkilotrójmetyloamoniowe, benzylodwumetyloamoniowe, dialkilodimetyloamoniowe i rzadziej alkilopirydyniowe oraz alkiloimidazolinowe. Określano między innymi wpływ na przebieg biodegradacji ilości węgla w prostym łańcuchu hydrofobowym, jak i obecności takich podstawników przy azocie, jak grupa benzyłowa [6, 15, 48, 58]. Zajmowano się także wpływem obecności takich anionów, jak chlorek, bromek, jodek, octan [6, 57, 59, 73]. Dalsze badania dotyczyły wpływu obecności dwóch łańcuchów hydrofobowych w cząsteczce KSPC lub wpływu rozgałęzionej struktury łańcucha hydrofobowego. Te ostatnie prace łączyły się z oceną surowców wykorzystywanych w procesie syntezy KSPC [6, 10, 59, 73]. Wymienione badania prowadzono w różnych warunkach środowiskowych (zawsze jednak tlenowych) i korzystano z różnych technik pomiarowych. Badania wykonywano w układach zasilanych okresowo lub w sposób ciągły substratem, stosowano mikroflorę niezaadaptowaną lub zaadaptowaną do rozkładu danego substratu. Doświadczenia prowadzono przy niskim jak i przy wysokim stężeniu biomasy (od 10 do 3000 mg suchej masy osadu czynnego/dm<sup>3</sup>) oraz przy różnych stężeniach początkowych kationowych substancji powierzchniowo czynnych (od 0.001 do 500 mg/dm<sup>3</sup>). Przy ocenie procesu biodegradacji korzystano z pomiarów biochemicznego lub chemicznego zapotrzebowania tlenu, stężenia rozpuszczonego węgla organicznego, stężenia KSPC (określonego różnymi technikami).

Różne warunki inkubacji mikroorganizmów i różne sposoby oceny procesu dostarczyły wielu informacji na temat biodegradacji KSPC. Można więc podać pewne prawidłowości, które dotyczą: długości nierozgałęzionego łańcucha hydrofobowego, obecności grupy benzyłowej oraz obecności drugiego łańcucha hydrofobowego w cząsteczce.



Szybkość biodegradacji osiągała największą wartość, gdy łańcuch hydrofobowy posiadał 10 lub 12 węgli (w zależności od stężenia początkowego KSPC). Stwierdzono, że obecność grupy benzylowej w cząsteczce też zależnie od stężenia początkowego opóźniała lub przyspieszała szybkość biochemicznego utleniania, obecność drugiego łańcucha hydrofobowego w cząsteczce opóźniała biodegradację [6, 15, 19, 25, 26, 28, 29, 48, 57, 59, 69, 73, 78].

Prowadzenie badań biodegradacyjnych nie stwarza większych problemów, gdy testowane substraty stanowią indywidualne chemiczne, a badania prowadzi się przy udziale czystych kultur. W przypadku substancji powierzchniowo czynnych jest prawie prawidłowością, że są one mieszaniną izomerów i homologów zawierających zmienną ilość węgli w łańcuchu. Z doniesień literaturowych wynika, że niektóre mikroorganizmy preferują krótsze, a inne dłuższe łańcuchy węglowodorowe. Wydaje się więc uzasadnione, że korzystne jest prowadzenie badań biodegradacyjnych z użyciem mieszanych populacji mikroorganizmów. Nie oznacza to, że niecelowe są badania z użyciem czystych kultur [33, 42].

W trakcie prowadzenia biodegradacji można uzyskać dane o wzroście populacji na podłożu, w którym SPC stanowiła jedyne źródło węgla, o zmianach aktywności fizjologicznej drobno-ustrojów lub o zaniku substratu w środowisku. Informacje te nie są wystarczające, aby określić, czy nastąpiło całkowite biochemiczne utlenienie badanej substancji. Chcąc uzyskać zadowalającą odpowiedź na to pytanie, konieczne jest zastosowanie specjalnych technik pomiarowych, które by pozwalały śledzić przemiany na poziomie cząsteczki. W badaniach substancji o tak złożonej budowie jak KSPC ma to szczególne znaczenie, gdyż w przypadku występowania w cząsteczce azotu może prowadzić do powstawania i gromadzenia się w środowisku pośrednich produktów utlenienia, takich jak nitrozoaminy [7].

Przykładowo w dostępnej literaturze znaleziono tylko jedną pracę, dotyczącą biodegradacji chlorku dialkilodimetyloamoniowego, w której zwrócono uwagę na przemiany azotu [19]. W pracy wykazano, że ulegał mineralizacji do azotanów.

Większość prac nad biochemicznym utlenianiem KSPC dotyczyła degradacji związanej z utratą właściwości powierzchniowo czynnych cząsteczki i wyznaczeniem chemicznego lub biochemicznego zapotrzebowania tlenu potrzebnego na utlenienie tej substancji [57, 59, 64]. Istnieją tylko nieliczne prace, w których korzystając ze spektroskopii IR lub znaczników radioaktywnych albo, z chromatografii, śledzono przemiany węgla pochodzącego z łańcucha hydrofobowego lub z grupy metylowej lub benzylowej do  $\text{CO}_2$  i biomasy i określano kolejność utleniania poszczególnych grup funkcyjnych KSPC [13, 19, 58, 59]. W pracach tych wykazano, że podczas biodegradacji soli decylotrymetyloamoniowej zachodził proces  $\beta$ -oksydacji oraz że w przypadku soli dialkilodimetyloamoniowej utlenianie grupy metylowej przy azocie zachodziło nieco wcześniej niż utlenianie grupy metylowej znajdującej się w łańcuchu hydrofobowym. Uzyskano dwa różne wnioski dotyczące kolejności utleniania grupy benzylowej soli cetylobenzylodimetyloamoniowej. Badacze stwierdzili, że utlenianie grupy benzylowej mogło zachodzić wcześniej (lub nie) niż utlenianie innych podstawników przy azocie. Przypuszcza się, że kolejność utleniania była związana z budową hydrofobu.

W dostępnej literaturze nie znaleziono prac dotyczących wpływu obecności spolimeryzowanych grup tlenku etylenu (przyłączonych w dwóch miejscach do azotu) na proces biodegradacji całkowitej KSPC posiadających jeden nierozgałęziony łańcuch hydrofobowy i to zarówno przy nieobecności, jak i obecności grupy benzylowej. Obecność spolimeryzowanych grup tlenku etylenu w cząsteczce wpływa na zwiększenie rozpuszczalności KSPC w środowisku wodnym, co z kolei może przyczy-

niać się do wykorzystywania tych substancji przez mikroorganizmy jako drugorzędного źródła węgla i azotu.

Dlatego za Swisherem [59] można uznać, że dane odnośnie do biodegradacji KSPC i mechanizmu tego procesu są raczej skąpe i nie dotyczą one wielu typów obecnie produkowanych KSPC.

## 2. CEL PRACY

W świetle dotychczasowych badań za istotne i wymagające wyjaśnienia uważa się następujące problemy:

- wpływ łatwo utleniaelnego substratu na biodegradację KSPC,
- utlenianie czwartorzędowego azotu,
- wpływ struktury KSPC na biodegradację,
- mechanizm biodegradacji KSPC .

Użyte w badaniach KSPC syntetyzowane były na bazie tych samych kwasów tłuszczowych pochodzenia roślinnego, różniły się rodzajem podstawników przy czwartorzędowym azocie. Testowane KSPC posiadały łańcuch hydrofobowy zawierający głównie od 18 do 22 węgli, azot czwartorzędowy oraz odpowiednio: trzy grupy metylowe lub jedną grupę metylową i 15 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu (podstawionych w dwóch miejscach przy azocie) lub jedną grupę benzyłową i 5 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu lub grupę benzyłową i 11 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu.

W pracy korzystano z mieszanych populacji drobnoustrojów osadu czynnego, specjalnie adaptowanych do prowadzenia procesu degradacyjnego. Proces adaptacji zapewniał uzyskanie licznych kultur zdolnych do biochemicznego utleniania substancji posiadających tak skomplikowane struktury jak czwartorzędowe sole amoniowe. Zdecydowano, że badania prowadzone będą w warunkach dynamicznych w czterech etapach. Etap pierwszy przewidywał hodowlę mikroorganizmów osadu czynnego przy zasilaniu łatwo rozkładalnym substratem, drugi adaptację



mikroorganizmów do rozkładu KSPC, trzeci hodowlę mikroorganizmów osadu czynnego przy zasilaniu łatwo rozkładalnym substratem i KSPC w stężeniu  $20.0 \text{ mg/dm}^3$ , czwarty etap hodowlę przy zasilaniu mikroorganizmów tylko preparatem zawierającym KSPC.

Do oceny procesu i stopnia biodegradacji stosowano pomiary standardowe (stężenia KSPC i CZT) oraz spektroskopię IR i  $^1\text{H NMR}$  (do śledzenia mechanizmu procesu degradacyjnego). Pomiary spektroskopowe pozwalają nie tylko na obserwowanie procesu skracania łańcucha węglowodorowego, ale również na określanie obecności wybranych podstawników przed i po procesie biodegradacji.

### 3. CZĘŚĆ OPISOWA

#### 3.1. WPROWADZENIE

Obecna produkcja światowa KSPC zbliża się do około 10 procent wszystkich wytwarzanych substancji powierzchniowo czynnych. W kraju produkuje się KSPC między innymi w Zakładach Azotowych w Kędzierzynie-Koźlu, gdzie synteza oparta jest na recepturze opracowanej w Instytucie Ciężkiej Syntezy Organicznej w Blachowni [36, 37]. Wytwarzane są podstawowe typy KSPC, takie jak sole oksyetylowanych amin, sole amin i czwartorzędowe sole amoniowe.

Z kationowych substancji powierzchniowo czynnych praktyczne znaczenie mają czwartorzędowe sole amoniowe, które stanowią około 70 % produkowanych substancji i dlatego właśnie je wzięto pod uwagę w przedstawionym opracowaniu [1, 2].

#### 3.2. WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNE KSPC

Kationowe substancje powierzchniowo czynne mają budowę polarną. W wodzie cząsteczka KSPC ulega dysocjacji dając anion i kation, który posiada właściwości powierzchniowo czynne. Elementem hydrofobowym jest zazwyczaj długi łańcuch węglowodorowy, natomiast hydrofilowym w przypadku czwartorzędowych soli amoniowych grupa amoniowa. Z długością łańcucha łączy się rozpuszczalność w wodzie. Węglowodory o ilości węgla w łańcuchu powyżej 17 są substancjami stałymi. Wbudowanie w cząsteczkę czwartorzędowych soli amoniowych związków



polietoksyloowanych również zmienia rozpuszczalność. Wraz ze wzrostem ilości przyłączanych grup tlenku etylenu obserwuje się wzrost rozpuszczalności w wodzie. Natomiast w miarę zwiększania ilości węgla w łańcuchu hydrofobowym zwiększa się również zdolność do tworzenia, w bardziej stężonych roztworach wodnych, wielkocząsteczkowych skupisk zwanych micelami. Micele powstają samorzutnie wówczas, gdy zostanie przekroczone krytyczne stężenie micelarne. Powoduje to zmianę właściwości roztworu [38, 47, 57, 59, 64]. Roztwory wodne soli amoniowych mają odczyn obojętny. Do podstawowych cech KSPC należy: zdolność zwilżająca, dyspergująca, emulgująca, pianotwórcza, dezynfekcyjna oraz antykorozyjna. Zachowują trwałość przy zmianach temperatury i odczynu. Nie posiadają zapachu ani właściwości drażniących i nie wywołują uczuleń. Inną charakterystyczną cechą jest adsorpcja na powierzchniach ciał stałych. Adsorpcja zachodzi pomiędzy dodatnio naładowanym atomem azotu a elektrycznie ujemną powierzchnią [59]. Roztwory wodne nie tracą swoich właściwości przy dłuższym przechowywaniu. Można je mieszać z innymi kationowo aktywnymi i niejonowymi substancjami powierzchniowo czynnymi, z licznymi solami nieorganicznymi oraz z sulfonamidami, streptomycyną i rozpuszczalnikami organicznymi. Soli tych natomiast nie można mieszać z anionowymi substancjami powierzchniowo czynnymi, takimi jak mydła, alkilosulfonaty, alkiloarylosulfaty lub saponiny, z którymi wytwarzają wypadające osady kompleksowe. KSPC pod działaniem chlorowców są utleniane [38, 57, 59].

### 3.3. ANTYSEPTYCZNE WŁAŚCIWOŚCI KSPC

Właściwości toksyczne kationowych substancji powierzchniowo czynnych zostały odkryte przez Domagka w 1935 roku i od tego czasu zaczęły uzyskiwać znaczenie jako substancje

dezynfekujące. Ponowne zainteresowanie tymi substancjami nastąpiło w latach siedemdziesiątych i stale wzrasta [1, 2].

Przyjmuje się, że działanie toksyczne kationowych substancji powierzchniowo czynnych na mikroorganizmy wiąże się z obecnością w cząsteczce ładunku dodatniego przy azocie amoniowym (nie jest to zasada generalna). KSPC w pierwszej kolejności są sorbowane przez elementy strukturalne mikroorganizmów (związane jest z to właściwościami lipofilowymi kationu). Po czym dochodzi do przenikania kationu przez zespół ścianowo-błonowy komórki, następnie do wiązania się z błoną cytoplazmatyczną i do jej uszkodzenia. Proces przenikania zależy od budowy zespołu ścianowo-błonowego komórki i inaczej przebiega w wypadku bakterii Gram-ujemnych, a inaczej w wypadku Gram-dodatnich. Kation uszkadzając błonę niszczy jej strukturę, co prowadzi do zniszczenia komórki [38].

Antyseptyczne właściwości produkowanych w kraju aminotłuszczowych i ich pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych badali w szerokim zakresie Kędzia, Muszyński, Mirska i Nowak [38]. Autorzy badali właściwości dezynfekcyjne. Określali działanie bakteriobójcze, prątkobójcze, grzybobójcze, przeciwwirusowe oraz toksyczność w stosunku do ssaków. Wyjaśniając mechanizm działania na mikroorganizmy, zwrócili uwagę na związek między strukturą cząsteczki KSPC i usytuowaniem grup funkcyjnych a właściwościami dezynfekcyjnymi. Stwierdzili, że maksymalna toksyczność KSPC występowała przy obecności w łańcuchu węglowodorowym od 12 do 16 węgli, a obniżała się zarówno przy skracaniu, jak i wydłużaniu łańcucha alkilowego. Stwierdzili także, że na zwiększanie aktywności dezynfekcyjnej wpływało podstawienie czwartorzędowego azotu drugim łańcuchem alkilowym lub wprowadzenie w miejsce podstawnika metylowego grupy benzylowej. Było to zgodne z obserwacjami przedstawionymi w innych publikacjach [57, 59, 64].



### 3.4. BIODEGRADACJA KSPC

Przez pojęcie biodegradacji powszechnie rozumie się biochemiczny rozkład substancji przy udziale mikroorganizmów. Najodpowiedniejsze z punktu widzenia biochemicznej degradacji są te drobnoustroje, które metabolizując badane substraty wykorzystują je jako źródło węgla.

Rozróżnia się pierwotną i całkowitą biodegradację związków powierzchniowo czynnych. O biodegradacji pierwotnej mówi się wtedy, gdy rozkład substancji powoduje utratę właściwości powierzchniowo czynnych. Natomiast całkowita biodegradacja zachodzi wówczas, gdy stwierdza się, że nastąpiła przemiana substratu organicznego do  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}_3^-$  lub też  $\text{SO}_4^{2-}$  oraz do biomasy drobnoustrojowej. W większości prac dotyczących biochemicznego utleniania określano biodegradację pierwotną. Do oceny procesu wykorzystywano pomiary zaniku własności powierzchniowo czynnych roztworu, poboru tlenu na biochemiczne utlenienie SPC w kilku- lub kilkunastodobowym teście BZT, wzrostu aktywności oddechowej mikroorganizmów w pomiarach respirometrycznych [45, 57, 59, 64, 67, 75, 76, 78]. Stwierdzenie to dotyczy również prac nad biodegradacją kationowych substancji powierzchniowo czynnych [10, 14, 15, 26, 27, 29, 32, 45, 48, 57, 59, 68, 69, 72, 73, 74].

Biodegradacji całkowitej KSPC dotyczyły tylko nieliczne badania. W pracach tych korzystano z takich technik pomiarowych, jak spektroskopia IR,  $^1\text{H}$  NMR lub technika znakowania  $^{14}\text{C}$  oraz chromatografia cienkowarstwowa [6, 13, 19, 21, 30, 33-35, 58].

#### 3.4.1. Wybrane zagadnienia związane z adaptacją drobnoustrojów i biodegradacją KSPC

Od pierwszych lat produkcji SPC w wielu ośrodkach naukowych prowadzono badania nad biodegradacją tych substancji. Wzrost zainteresowania problemami biochemicznej degradacji szczególnie nasilił się, kiedy rozpoczęły się kłopoty związane z pienieniem substancji powierzchniowo czynnych wprowadzanych do rzek [40, 70]. Prace nad biochemicznym rozkładem nowo syntetyzowanych SPC mogą być prowadzone różnymi metodami [17, 57, 59, 64]. W zależności od stężenia początkowego SPC, przyjętych warunków środowiskowych (tlenowe, beztlenowe) [9, 66] i rodzaju inkubowanych mikroorganizmów (populacje mieszane, czyste kultury, populacje pobrane z urządzeń technicznych lub ze środowiska naturalnego, wstępnie adaptowane lub nieadaptowane do rozkładu badanej SPC) [19, 35, 42, 44] sposób prowadzenia hodowli (okresowy, półciągły, ciągły) jak i okres badań (od kilku do kilkadziesiąt dni) będą odmienne [5, 8, 23, 25, 29, 32, 46, 47, 56]. Na sposób prowadzenia hodowli może mieć wpływ rodzaj określanej biodegradacji pierwotnej lub całkowitej [11, 58].

Spośród kilkadziesiąt receptur podawanych przez światową literaturę i dotyczących biodegradacji pierwotnej, prowadzonej w warunkach tlenowych przy współudziale mieszanej populacji mikroorganizmów, można wyróżnić zaledwie kilka stale używanych, które dzieli się na tak zwane testy odsiewające i badania potwierdzające [12, 59, 62]. Do testów odsiewających można zaliczyć badania prowadzone w układzie zamkniętym i są to pomiary respirometryczne prowadzone przy wykorzystaniu aparatu Warburga i innych respirometrów oraz pomiary w zamkniętych butelkach prowadzone zgodnie z zasadą oznaczania BZT [8, 59]. Pomiary są prowadzone zarówno przy niskim stężeniu biomasy mikroorganizmów, jak i SPC (pomiary



w zamkniętych butelkach) lub przy wysokim stężeniu biomasy i SPC (w urządzeniach respirometrycznych), w warunkach kiedy to badana SPC stanowi główne źródło węgla dla inkubowanych drobnoustojów. Stopień biodegradacji określa się poprzez porównanie faktycznie oznaczonego zapotrzebowania tlenu z teoretycznym zapotrzebowaniem tlenu. W pomiarach respirometrycznych czasami oznacza się także produkcję dwutlenku węgla. Do testów odsiewających można zaliczyć też te, które prowadzone są w układach otwartych, przy małym udziale biomasy w warunkach naśladujących procesy zachodzące w naturalnym środowisku rzeczonym. Stosując nieduże stężenia substancji powierzchniowo czynnej, którą wprowadza się jednorazowo i która stanowi główne źródło węgla, czas inkubacji od kilku do kilkudziesięciu dni, prowadzi się codzienną obserwację zaniku SPC w badanym środowisku. Pomiarzy często uzupełniane są oznaczeniem CZT lub RWO. Uwzględniając to, że SPC czasami stanowią tylko drugorzędne źródło węgla dla mikroorganizmów, zleca się też prowadzenie badań w obecności innego łatwo utleniającego substratu, na przykład glukozy. Biodegradację określa się na podstawie szybkości zanikania substratu w środowisku [39, 57, 59, 64].

Do badań potwierdzających zalicza się prowadzone z wykorzystaniem hodowli osadu czynnego badania przy ciągłym (lub półciągłym) zasilaniu mikroorganizmów łatwo rozkładalnym substratem i badaną SPC [57, 59, 64].

W kraju zostały opracowane (opierając się na badaniach prowadzonych na Zachodzie) normy określające sposób prowadzenia badań w warunkach tlenowych z wykorzystaniem mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego [51 - 53]. Zaleca się prowadzenie biodegradacji SPC w obecności łatwo utleniającego substratu w warunkach dynamicznych oraz w statycznych. Dla badań w warunkach dynamicznych proponuje się prowadzenie procesu wstępnej adaptacji drobnoustrojów do

rozkładu badanych substratów przy stopniowym zwiększaniu stężenia w zakresie od 2.0 do 5.0 mg SPC/dm<sup>3</sup>, a następnie prowadzenie właściwego utleniania przy dawkach 5.0 do 20.0 mg SPC/dm<sup>3</sup>. Ustalono zawartość zawiesiny osadu czynnego 3.0 g/dm<sup>3</sup>, 3-godzinny czas napowietrzania substratu oraz natlenianie zapewniające stężenie tlenu rozpuszczonego w komorze napowietrzania od 1.0 do 2.0 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>. Poza tym określono również skład ścieków syntetycznych, który oparto na peptonie kazeinowym i suchym bulionie. Przewidziano, że czas prowadzenia eksperymentu powinien wynosić nie mniej niż 42 dni, z czego 14 dni przeznaczono na proces wstępnej adaptacji drobnoustrojów osadu czynnego. Przepisy te opracowano do oceny efektywności biochemicznego utleniania głównie anionowych i niejonowych substancji powierzchniowo czynnych. Jak wynika z opisu norma, daje ogólne wskazówki dla przebiegu hodowli mikroorganizmów. Zapewne dlatego można znaleźć prace wprowadzające szereg uzupełnień odnośnie do warunków hodowli. Między innymi określają one bardziej dokładnie czas potrzebny do przeprowadzenia procesu wstępnej adaptacji lub prace sugerujące wprowadzenie dodatkowych oznaczeń opisujących stan fizjologiczny mikroorganizmów i pozwalających śledzić proces adaptacji [15, 25, 31, 41, 72].

Niektórzy autorzy (np. Grabińska Sota [15]) uważają, że uzyskanie populacji zaadaptowanej do rozkładu kationowych substancji powierzchniowo czynnych zależy od sposobu dawkowania KSPC w okresie adaptacji. Autorka proponuje, aby dozowanie rozpoczynać od dawki 1.0 lub nawet od 0.5 mg KSPC/dm<sup>3</sup>. Czas wstępnej adaptacji do rozkładu KSPC, przy stężeniach 1.0 i 2.0 mg KSPC/dm<sup>3</sup>, może wynosić 14 dni lub więcej [26]. Przy zmianie dawek należy zwracać uwagę na aktywność oddechową mikroorganizmów osadu czynnego. W skrajnych przypadkach mikroorganizmy mogą całkowicie utracić swą aktywność.



Może to prowadzić do rozkładu skupień osadu czynnego i pojawienia się w odpływie bakterii wolnopływających [68].

W innych pracach zaobserwowano, że dopiero dłuższe dozowanie wyższych dawek, przykładowo 20.0 mg KSPC/dm<sup>3</sup>, ujawniło niekorzystne działanie kationowych substancji powierzchniowo czynnych, które powodowało przechodzenie kłaczkowego osadu czynnego w postać kulistą [25]. Zauważono przy tym, że wydłużenie badań do 21 dni przy dawce 20.0 mg KSPC/dm<sup>3</sup> było korzystne. Pozwalało na uzyskanie odpowiedniej ilości wyników potrzebnych do przeprowadzenia matematycznej interpretacji procesu biodegradacji opierając się na zmodyfikowanym I równaniu Eckenfeldera. Wyliczone współczynniki pozwalały sądzić o zmianach szybkości biodegradacji łatwo utleniającego substratu po wprowadzeniu KSPC oraz o obecności w odpływie metabolitów, świadczących o częściowym tylko rozkładzie substratu [27].

Literatura dotycząca biodegradacji substancji organicznych w tym i SPC podaje liczne przypadki wykorzystywania oznaczeń aktywności oddechowej lub dehydrogenazowej w celu określania stanu fizjologicznego mikroorganizmów biorących udział w procesie [24, 41, 43, 54, 72].

Z przeprowadzonych przez Janosz-Rajczyk i Owsiak [24] badań nad biodegradacją wieloskładnikowego preparatu o nazwie Emulkop wynikało, że wzrost aktywności oddechowej po procesie adaptacji obserwowano w próbach, w których źródłem węgla były substancje powierzchniowo czynne ulegające rozkładowi biochemicznemu. W przypadkach gdy badano substraty trudno rozkładalne tak zwane "twarde" SPC zależności takich nie obserwowano.

Zdybiewska i Janosz-Rajczyk [71] w pracy nad biologicznym utlenianiem dwuskładnikowego preparatu zawierającego niejonowe i kationowe substancje powierzchniowo czynne wykazały, że lepsze efekty w usuwaniu łatwo utleniającego substratu

uzyskiwano w obecności mikroorganizmów osadu czynnego o podwyższonej aktywności oddechowej. Aktywność tę powodowało wysokie obciążenie substratowe osadu czynnego. Obserwowano wówczas eliminację hamowania współzawodniczego. Można więc stwierdzić, że pomiary aktywności fizjologicznej drobnoustrojów mogą być dodatkowym źródłem informacji o możliwościach adaptacyjnych mikroorganizmów lub o sposobie prowadzenia biologicznej degradacji trudno rozkładalnych substratów.

#### 3.4.2. Mikroorganizmy biorące udział w biodegradacji KSPC

Badania biodegradacyjne przeważnie prowadzi się z użyciem mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego lub na zespołach mikroorganizmów pobranych z rzek [4, 12, 18, 59]. Tylko w nielicznych przypadkach prowadzona jest także identyfikacja mikroorganizmów biorących udział w tym procesie. Z pracy Fengera i współautorów [13] wynika, że z osadu czynnego adaptowanego do rozkładu chlorku tetradecylodwumetylobenzyloamoniowego wyizolowano bakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Comamonas*, aktywnie uczestniczące w procesie degradacyjnym. Podobną pracę przedstawili Arkadijewa i współpracownicy [5]. Po wyizolowaniu z osadu czynnego adaptowanego do rozkładu KSPC szeregu szczepów bakteryjnych z rodzaju *Pseudomonas*, *Aeromonas* i *Bacillus*, następnie sprawdzali możliwości wzrostu bakterii na podłożu zawierającym testowaną substancję. Autorzy wykazali, że jedynie bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mogły wykorzystywać badaną KSPC jako podstawowe źródło węgla i azotu.

Próby izolowania czystych kultur bakterii degradujących preparaty zawierające kationowe substancje powierzchniowo czynne prowadziła również Taranowa [61]. Autorce udało się wyodrębnić heterotroficzne, Gram-ujemne, pałeczkowate bakterie wykorzystujące jako źródło węgla dwa badane preparaty w stężeniach 400.0 i 600.0 mg/dm<sup>3</sup>.



Z dostępnej literatury wynika, że jedną z nielicznych prac nad biodegradacją KSPC przez czystą kulturę prowadziła Janota-Basalik i współautorki [35]. Inkubując kulturę *Pseudomonas pictorum* doprowadziły do degradacji chlorku laurylodwumetyloamoniowego i laurylopirydynowego w obecności ekstraktu drożdżowego. Adair i współautorzy [3] podali również, że czysta kultura *Pseudomonas cepacia* mogła wykorzystywać wybraną czwartorzędową sól amoniową jako jedyne źródło węgla, a w przypadku braku innych źródeł również azot znajdujący się w tym związku.

Stawska i współautorzy [57] zwrócili uwagę na problemy występujące podczas przechowywania kultur posiadających zdolności do biodegradacji substancji powierzchniowo czynnych. Autorzy ci donoszą, że podczas trwającego dłuższy czas przechowywania szczepy traciły nabytą zdolność biodegradacji SPC. Podali także, że długotrwały kontakt z SPC mógł powodować zmienność morfologiczną komórek i kolonii, mógł też prowadzić do występowania defektów podczas syntezy zespołu ścianowo-błonowego i utratę właściwości hydrofobowych powierzchni komórek.

### 3.4.3. Zastosowanie specjalnych technik pomiarowych w badaniu biodegradacji KSPC

Jedną z pierwszych prac, w której zastosowano do identyfikacji i analizy substancji powierzchniowo czynnych spektroskopię IR była praca Hummela z 1962 roku. Technikę tę do studiów nad biodegradacją substancji powierzchniowo czynnych próbowali stosować Frazee, Osburn i Crister [64]. Ale dopiero w 1973 Fenger, Mandrup, Rohde i Sorensen [13] oraz w 1977 Baleux i Caumette [6], a następnie w 1983 i 1985 r. Hellmann [18, 20] zastosowali spektroskopowe badanie widm IR do oceny biodegradacji substancji kationowo czynnych. W kraju próby wykorzystania spektroskopii IR do badań biochemicznego utle-

niania KSPC przedstawili Janosz-Rajczyk i współautorzy [28] oraz Janosz-Rajczyk [30, 33, 34]. Wynika z tego, że jest tylko kilka prac, w których zastosowano spektroskopię IR w badaniach biodegradacji kationowych substancji powierzchniowo czynnych. Należy jednak zaznaczyć, że w badaniach anionowych i niejonowych substancji powierzchniowo czynnych technikę tę stosowano częściej [18, 20, 21, 57, 59].

Autorzy przyjmowali różne metody dla interpretacji widm. Badacze francuscy obserwując widma IR prób przed i po biodegradacji (hodowlę prowadzili w warunkach statycznych przy jednorazowym zasilaniu substratem), rozpatrywali zmiany jakościowe występujące w pasmach charakterystycznych dla grup funkcyjnych  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_3$  i na tej podstawie sądzili o biodegradacji badanych substratów [6].

Spektroskopię IR w połączeniu z chromatografią gazową w badaniach biodegradacyjnych tetradecylodwumetylobenzylamoniowego chlorku wykorzystywali Fenger i współautorzy [11]. Autorzy ci po przeprowadzeniu adaptacji mikroorganizmów osadu czynnego do badanej soli amoniowej strali się następnie określić pośrednie produkty utlenienia powstające w procesie biodegradacji. W pierwszej kolejności na podstawie widma IR wykonanego dla odpływu z bioreaktora (po uprzednim zatężeniu próby) określano obecność pasm charakterystycznych dla grup funkcyjnych obecnych w badanej KSPC oraz pojawianie się nowych związków z procesem biodegradacji. Następnie za pomocą chromatograficznych pomiarów określano skład chemiczny pośrednich produktów utlenienia.

Na możliwości wykorzystywania spektroskopii IR w połączeniu z chromatografią cienkowarstwową wskazał Hellmann [18 - 21]. Autor wykonywał pomiary widm IR dla hodowli mikroorganizmów, okresowo zasilanej chlorkiem dwustearynodwumetyloamoniowym [19]. Rozdział chromatograficzny umożliwiał uzyskiwanie z ekstraktów pośrednich produktów utlenienia,



które z kolei po przeniesieniu z płytki żelowej poddawano analizie spektralnej IR. Zabiegi te były pracochłonne, ale pozwalały na uzyskiwanie "czystych" widm wielu pośrednich produktów biodegradacji.

Inny sposób oceny widm IR zaproponowała Janosz-Rajczyk [33]. Po adaptacji drobnoustrojów osadu czynnego do rozkładu badanych KSPC w warunkach dynamicznych prowadzono dalszą hodowlę zasilając ją łatwo rozkładalnym substratem wzbogaconym w KSPC przy stężeniu  $20.0 \text{ mg/dm}^3$ . Następnie dla zatężonego dopływu i odpływu, czyli dla substratu przed i po procesie degradacyjnym wykonywano analizę spektralną. Ocena widm polegała na ilościowym określaniu zmian stosunku grup  $-\text{CH}_3$  do  $-\text{CH}_2-$  w poszczególnych próbach. Wzrost wartości tego stosunku świadczył o postępującym procesie degradacji łańcucha węglowodorowego.

Do specjalnych technik pomiarowych oddających duże usługi przy badaniu struktury SPC i jej zmian podczas degradacji należy również spektroskopia  $^1\text{H}$  NMR. Jednym z pierwszych, którzy w 1970 r. zastosowali tę technikę widmową do obadania struktury ASPC, KSPC i amfoterycznych SPC, był König [64]. W badaniach biodegradacji ASPC, NSPC i KSPC technikę tę stosowali w latach osiemdziesiątych Stawska i współautorzy [57], a w dziewięćdziesiątych Janosz-Rajczyk [30, 33, 34]. Główne zalety tej metody to możliwość stwierdzania obecności grup funkcyjnych na podstawie sygnałów pochodzących od ich protonów oraz określania na podstawie krzywych integracji względnej ilości protonów [4, 55, 65].

Literatura dotycząca biodegradacji anionowych i niejonowych substancji powierzchniowo czynnych podaje również przykłady korzystania z chromatografii gazowej [11, 57, 59, 64]. Technikę tę w badaniach biodegradacyjnych KSPC stosowano w mniejszym zakresie [13]. Znane są również przykłady wykorzystywania tej techniki podczas obserwacji katalitycznego

rozkładu KSPC. Chromatografię cienkowarstwową wykorzystywali w swoich badaniach Janota-Bassalik i współautorki [35]. Do specjalnych technik należą także pomiary izotopowe. Według Swishera [59] jako jeden z pierwszych pomiary z wykorzystaniem  $^{14}\text{C}$  przeprowadził dla KSPC w 1973 r. Krzeminski, następne badania prowadzili w 1983 r. Larson i Sullivan.

#### 3.4.4. Czynniki określające biodegradację pierwotną KSPC

Dane literaturowe podają, że biochemiczne utlenianie KSPC zależy od takich samych czynników jak proces biodegradacji innych związków organicznych, w tym także ASPC i NSPC. Biodegradację określają więc rozpuszczalność i koncentracja SPC, chemiczna struktura molekuly i masa cząsteczkowa, wielkość współczynnika HLB, charakter wiązania pomiędzy grupą hydrofilową i hydrofobową oraz rodzaj mikroorganizmów biorących udział w procesie. Doniesienia literaturowe podają, że decydujący wpływ posiada struktura molekuly, w tym: długość łańcucha hydrofobowego (jego prostoliniowy lub rozgałęziony charakter, obecność czwartorzędowego węgla, występowanie dwóch łańcuchów hydrofobowych w cząsteczce), obecność pierścienia benzenowego, pierścienia pirydynowego lub imidazolowego, występowanie spolimeryzowanych grup tlenu etylenu, a także charakter anionu. W zdecydowanej większości prac zajmowano się wpływem struktury łańcucha KSPC na podatność na biodegradację. Najczęściej badanymi KSPC były substancje należące do czwartorzędowych soli amoniowych [57, 59, 64]. Według Swishera [59] systematyczne badania biodegradacji chlorków alkilotrójmetloamoniowych i pierwszorzędowych alkioloamin (posiadających jeden nierozgałęziony łańcuch hydrofobowy) wykazały, że najłatwiej ulegały biodegradacji preparaty z 10 (Masuda i Miura) lub 12 (Riuz Cruz) węglami w łańcuchu. Badania Riuz Cruza były prowadzone przy współdziałaniu mikroflory pobranej z wody rzecznej, przy



początkowym stężeniu KSPC  $5.0 \text{ mg/dm}^3$ . Biodegradację oceniano na podstawie zaniku specyficznej reakcji z błękitem disulfinowym, wyznaczając w dobach czas połowicznego zaniku KSPC. Natomiast doświadczenia Masudy i Miury były prowadzone przy współudziale mieszanej populacji drobnoustrojów, przy początkowej koncentracji KSPC  $20.0 \text{ mg/dm}^3$ . Biodegradację oceniano na podstawie zużycia tlenu przez mikroorganizmy (porównywanego do teoretycznego zapotrzebowaniem tlenu) w 10-dniowych pomiarach respirometrycznych. Prowadzone przez tych samych autorów badania dla KSPC, posiadających w miejscu grupy metylowej grupą benzyłową, wykazały, że najłatwiej ulegały biodegradacji preparaty z 12 węglami w łańcuchu. Z tym że według Riuz Cruza wprowadzenie grupy benzyłowej hamowało biodegradację, a według Masudy i Miury przyspieszało proces. Według tych ostatnich autorów nie ulegały biodegradacji chlorki alkilotrójmetloamoniowe posiadające 18 węgli w łańcuchu. Także Pernak, Grabińska i Zdybiewska [47] badali wpływ ilości węgli w łańcuchu aliklowym na biodegradację KSPC. Badania przeprowadzili dla KSPC zawierających 8 lub 12 węgli w łańcuchu hydrofobowym kolejno dla chlorków: n-alkilotiometylopirydyniowych, 1-metylo-3-alkilotiometyloimidazolinowych i (n-alkilotiometylo)bis(2-hydroksyetylo)alkiloamoniowych. Biodegradację prowadzili przy współudziale mieszanej populacji drobnoustrojów w warunkach imitujących procesy biodegradacyjne zachodzące w rzece, przy początkowym stężeniu KSPC  $3.0 \text{ mg/dm}^3$ . Proces biodegradacji oceniali na podstawie zaniku specyficznej aktywności KSPC z błękitem disulfinowym. Wykazali, że szybszy rozkład KSPC zachodził wówczas, gdy ilość węgli w łańcuchu węglowodorowym wynosiła 8 (poza jednym przypadkiem dla chlorku (dodecyloiometylo)bis(2-hydroksyetylo)alkiloamoniowego). Ponieważ autorzy nie przeprowadzili badań dla chlorku oktylotrójmetloamoniowego ani dodecyloioamoniowego nie można było ocenić,

w jakim stopniu wpłynęło na biodegradację wprowadzenie do cząsteczki pierścienia pirydynowego, imidazolinowego lub innych grup funkcyjnych. Grabińska-Sota [15] w badaniach prowadzonych dla chlorków n-alkilotiometylopirydyniowych, 3-metylo(n-alkilotiometylo)pirydyniowych i 3,5-dimetylo(n-alkilotiometylo)pirydyniowych, przy współudziale mikroorganizmów osadu czynnego adaptowanych do rozkładu KSPC i przy stężeniu końcowym  $30.0 \text{ mg/dm}^3$  wykazała (na podstawie zaniku aktywności KSPC z błękitem disulfinowym), że z największą wydajnością biodegradacja zachodziła, gdy ilość węgli w łańcuchu hydrofobowym wynosiła 10 lub 12.

Z badań prowadzonych przez Zdybiewską i Janosz-Rajczyk [73] dla KSPC posiadających łańcuchy hydrofobowe o  $C_{18-22}$  wynikało, że możliwości biodegradacji określała zarówno budowa anionu, jak i kationu, struktura łańcuchów węglowodorowych i procentowy udział łańcuchów o określonej liczbie węgli (czyli także rodzaj surowca użytego podczas syntezy tych preparatów). Na podstawie pomiarów respirometrycznych, wykonywanych dla mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego (nieadaptowanych do rozkładu KSPC) przy zakresie stężeń od  $3.3$  do  $33.0 \text{ mg KSPC/dm}^3$ , stwierdzono, że niekorzystnie na biodegradację wpływało użycie do syntezy KSPC kwasów tłuszczowych otrzymywanych z rzepaku i oleiny (składnik naturalnych olejów). W kwasach rzepakowych łańcuchy  $C_{18}$  stanowiły około 34%;  $C_{20}$  10% i  $C_{22}$  45%. Natomiast w kwasach tłuszczowych pochodnych oleiny występowały głównie (w 84%) łańcuchy  $C_{18}$ . Ulegające łatwiejszemu utlenieniu KSPC były syntetyzowane na bazie kwasów stearynowych i zawierały w cząsteczce 70% łańcuchów  $C_{18}$  i 28%  $C_{16}$ . W pracy tej także wykazano, że odporność na biochemiczne utlenianie zwiększała się ze wzrostem od 2 do 11 ilości wprowadzanych grup tlenu etylenu wówczas, gdy w cząsteczce była nieobecna lub występowała grupa benzyłowa. Zdybiewska i Ja-



nosz-Rajczyk w tej samej pracy stwierdziły, że w przypadku wprowadzenia siarczanu alkilowanego w miejsce chlorku substancja stawała się bardziej oporna na biodegradację.

Zdybiewska, Rzeczycka i Tarniowy [78] w badaniach biodegradacyjnych prowadzonych (w układzie ciągłego zasilania substratem) przy współudziale wstępnie adaptowanej mieszanej populacji mikroorganizmów osadu czynnego, przy zakresie stężeń KSPC od 1 do 10.0 mg/dm<sup>3</sup> wykazały, że wzrost ilości grup tlenku etylenu z 8 na 22 w cząsteczce przyczyniał się do wzrostu oporności na utlenianie związku. Autorki sądziły tak na podstawie oznaczeń zaniku aktywności KSPC z błękitem disulfonowym, pomiaru BZT<sub>5</sub> i CZT.

Pitter prowadząc badania bromku heksadecylotrójmetyloamoniowego, chlorku heksadecylodwumetylobenzyloamoniowego, bromku heksadecylopirydyniowego oraz preparatu o nazwie handlowej Septonex (substancja aktywna tego preparatu posiadała w porównaniu z bromkiem heksadecylotrójmetyloamoniowym grupę hydroksyetylową przy pierwszym węglu w łańcuchu hydrofobowym) w obecności mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego, przy stężeniu KSPC 25.0 mg/dm<sup>3</sup>, stwierdził na podstawie zaniku aktywności KSPC z błękitem bromofenolowym, usunięcia CZT i RWO, że wprowadzenie do cząsteczki grupy benzylowej lub pierścienia pirydynowego lub hydroksyetylowej powodowało wzrost oporności na biodegradację. Ten sam autor porównując biodegradację czterech KSPC z innymi substratami stwierdził, że przyczyną małej szybkości procesu (około 100 razy mniejszej od związków łatwo rozkładalnych) była obecność czwartorzędowego azotu w cząsteczce [48].

Z badań prowadzonych przez Baleux i Caumette [6] dla 10 substancji kationowo czynnych wynikało, że tylko 5 ulegało biochemicznemu rozkładowi. Autorzy ci sądzili tak na podstawie pomiarów zaniku KSPC w środowisku wodnym i wzrostu liczebności drobnoustrojów populacji mieszanej biorących

udział w procesie. Uważali, że przyczyną trwałości KSPC była obecność w cząsteczce dodatkowego łańcucha hydrofobowego (w przypadku preparatu o nazwie Arquad) lub pierścienia benzenowego albo rozgałęzionego łańcucha alkilowego, lub obu tych czynników równocześnie (w przypadku preparatu o nazwie Hyamine 1622). Obecność czwartorzędowego węgla w cząsteczce jest powszechnie uważana za czynnik utrudniający proces biodegradacji [64]. W pracy zwrócono także uwagę, że z trzech badanych związków zawierających pierścień pirydynowy (chlorek, bromek i jodek heksadecylopirydynowy), tylko bromek ulegał biodegradacji. W pracy wykazano, że ulegał biodegradacji preparat z pierścieniem imidazolinowym, bromek i chlorek cetylotrójmetyloamoniowy oraz preparat o nazwie Ethoquad (którego substancją aktywną była KSPC o dwóch łańcuchach hydrofobowych o C<sub>18</sub> przyłączonych do czwartorzędowego azotu i posiadająca 15 spolimeryzowanych drobin tlenku etylenu). Swisher [59] podsumowując badania Ruiz Cruza, Masudy, Miura, Gawla, Yoshimury oraz Baluex i współautorów stwierdził, że wprowadzenie do cząsteczki dwóch łańcuchów hydrofobowych obniża zdolności jej do biodegradacji. Jednakże, jak wykazali Baluex i współautorzy, wprowadzenie do tej cząsteczki dodatkowo grup hydrofilowych skutecznie poprawiło zdolności biodegradacyjne KSPC [6].

W omawianych pracach badano głównie wpływ chemicznej struktury molekuli na biodegradację KSPC. Rozkład KSPC obserwowano do momentu utraty właściwości powierzchniowo czynnych przez cząsteczkę bądź stymulowania procesu oddechowego (w pomiarach respirometrycznych), lub obniżania się chemicznego i biochemicznego zapotrzebowania tlenu lub, rozpuszczonego węgla organicznego w trakcie prowadzenia procesu biodegradacji. Należy zaznaczyć, że poszczególne doświadczenia były prowadzone przy różnym stężeniu wyjściowym KSPC i biomasy. Różny był sposób zasilania hodowli (okresowy lub



ciągły). Duża różnorodność metodyki zastosowanej w badaniach wynikała z braku ujednoczonych przepisów dla prowadzenia biodegradacji, jak ma to miejsce w przypadku ASPC i NSPC [51]. Tak więc możliwe było uzyskiwanie różnych, często niekorespondujących ze sobą wyników. Było to wynikiem także korzystania z mikroflory w różnym stopniu zaadaptowanej do rozkładu KSPC, stosowania różnych stężeń początkowych dla KSPC (być może powyżej progu toksyczności), wprowadzania wraz z biomasą osadu czynnego dodatkowo łatwo przyswajalnego źródła węgla (stymulowanie procesu kometabolizmu). Ocenę wpływu zmian strukturalnych cząsteczki KSPC na proces biodegradacji utrudnia także fakt, że nie zawsze prowadzono badania w obecności KSPC uważanej za standard (posiadającej nierozgałęziony łańcuch hydrofobowy o określonej ilości węgla, podstawiony do czwartorzędowego azotu, do którego podstawione są trzy grupy metylowe). Można więc podać tylko ogólne czynniki wpływające na proces biodegradacji pierwotnej. I tak w głównej mierze wpływ na biochemiczne utlenianie miała budowa całej cząsteczki i związana z nią rozpuszczalność KSPC, w tym długość hydrofobowego łańcucha i obecność w drobinie podstawników, które zmieniały hydrofilowy (hydrofobowy) charakter cząsteczki oraz podatność tych podstawników na utlenianie przez drobnoustroje.

#### 3.4.5. Wpływ struktury KSPC na biodegradację całkowitą

Badania biodegradacji całkowitej wymagają stosowania specjalnych metod pomiarowych, takich jak technika izotopowa z wykorzystaniem  $^{14}\text{C}$  lub spektroskopia widm IR skojarzona z rozdziałem chromatograficznym prób lub ze spektroskopią  $^1\text{H}$  NMR [6, 13, 19, 30, 35, 58].

Sullivan [58] prowadził badania biodegradacji przez drobnoustroje osadu czynnego trzech chlorków dwustearynodwumetyloamoniowych, w których  $^{14}\text{C}$  znajdował się w grupie metylowej

lub metylenowej usytuowanej przy azocie, lub też w łańcuchu alifatycznym (we wszystkich pozycjach). Badania wykazały, że każdy znaczący węgiel posiadał taką samą wartość dla mikroorganizmów aklimatyzowanych do tych substratów w procesie przemiany do dwutlenku węgla i biomasy.

Podobne wyniki uzyskał Hellmann [19] prowadząc badania biodegradacji również dla chlorku dwustearynodwumetyloamoniowego. Autor opierając się na chromatograficznym rozdziale i analizie spektralnej IR, ustalał skład pośrednich produktów powstających w trakcie procesu biodegradacji. Takie prowadzenie badań pozwoliło na śledzenie mechanizmu procesu degradacyjnego. Hellmann stwierdził, że podczas biodegradacji zachodziło utlenianie azotu czwartorzędowego i pojawiały się azotany. Wykazał także, że równocześnie zachodziło systematyczne skracanie łańcucha alkilowego badanej KSPC.

Badania Sullivana, Hellmanna oraz Fengera i współautorów wykazały, że możliwe było uzyskanie całkowitej biodegradacji KSPC, która zawierała w swej strukturze czwartorzędowy azot podstawiony dwoma łańcuchami alifatycznymi o 14 węglach i dwoma grupami metylowymi lub jedną grupą metylową i grupą benzylową. Proces całkowitej biodegradacji przebiegał pod warunkiem przeprowadzenia wstępnej adaptacji mikroorganizmów do rozkładu tego substratu.

Można zaznaczyć, że technika izotopowa pozwoliła na jednoznaczne stwierdzenie, że KSPC stanowiła źródło węgla dla drobnoustrojów, a sposób zaproponowany przez Fengera i współautorów [13] lub Hellmanna [19] pozwalał również na śledzenie mechanizmu procesu degradacyjnego.

#### 3.5. MECHANIZM PROCESU BIODEGRADACJI SPC

Literatura podaje, że mechanizm biooksydacji SPC powinien być zgodny z istniejącymi w przyrodzie reakcjami charakte-



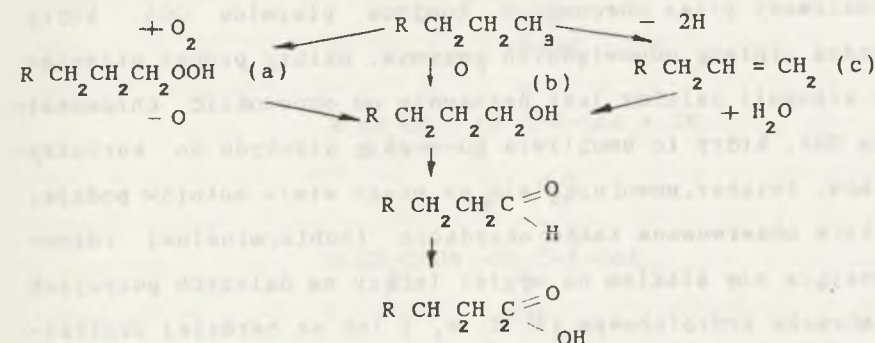
rystycznymi dla biochemicznego utleniania wielkocząsteczkowych substancji organicznych. Przedstawiając mechanizm biodegradacji zarówno dla ASPC, jak i dla NSPC oraz KSPC można oprzeć się na literaturze opisującej te reakcje. Przebieg całkowitej biodegradacji zależy od budowy chemicznej SPC (w tym zarówno od usytuowania grupy hydrofobowej, hydrofilowej, obecności i umiejscowienia grup funkcyjnych w cząsteczce), rodzaju mikroorganizmów uczestniczących w procesie i od warunków środowiskowych [6, 13, 19, 30, 57, 59, 64].

Ze względu na obecność w cząsteczce SPC grup funkcyjnych o podobnej budowie chemicznej ilość dróg biochemicznego rozkładu jest nieduża i do najważniejszych należą:

- utlenianie końcowej grupy metylowej na drodze  $\omega$ -oksydacji, które jest pierwszym stopniem biodegradacji łańcucha hydrofobowego,
- $\beta$ -oksydacja, czyli proces rozkładu kwasów tłuszczowych,
- utlenianie związków aromatycznych, które ma miejsce w wypadku występowania pierścienia benzenowego,
- utleniania łańcucha wieloeterowego.

W badaniach prowadzonych dla alkilosulfonianu (posiadającego od 10 do 18 węgli w łańcuchu) wykazano, że hydrolityczny rozkład cząsteczki SPC zachodził w miejscu przyłączenia grupy hydrofobowej do hydrofilowej. Początkowo sądzono, że rozkład hydrolityczny cząsteczki SPC przebiega tylko przy krótkich łańcuchach alkilowych posiadających cztery węgle. Dalsze doniesienia mówiły, że cząsteczki posiadające łańcuch hydrofobowy o 22 węglach mogły również podlegać takiemu rozkładowi. W wyniku biodegradacji pojawiały się w środowisku pośrednie produkty biodegradacji będące alkoholami, aldehydami lub kwasami tłuszczowymi o 22 węglach w łańcuchu [57]. Oznaczało to, że pierwszy etap biodegradacji SPC nie musi koniecznie rozpoczynać się od utleniania łańcucha hydrofobowego, co przez niektórych badaczy było uznawane za pewnik [77].

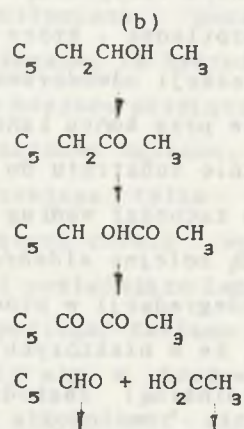
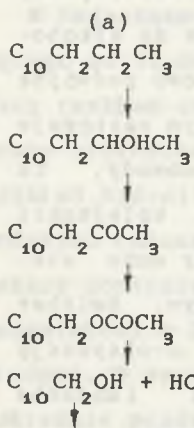
Rozpatrując proces  $\omega$ -utleniania grupy metylowej umiejscowionej na końcu prostego łańcucha alkilowego do grupy karboksylowej, można stwierdzić za Swisherem, że może odbywać się według trzech reakcji. Dwie (a i b) związane są z przyłączeniem tlenu, pozostała (c) z odwodorowaniem substratu.



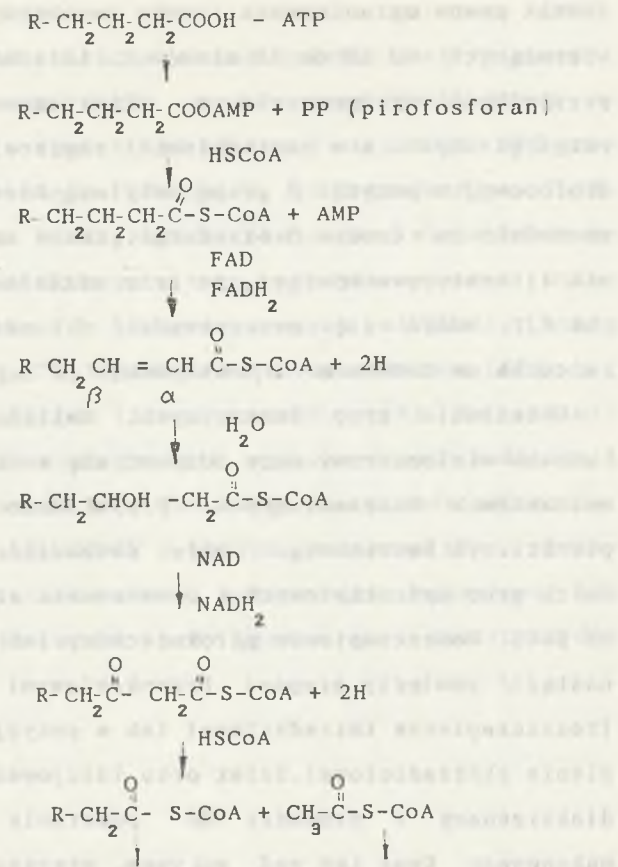
Literatura opisuje, że proces ten może być prowadzony przez liczne kultury rozszczepiające łańcuchy węglowodorowe, przy czym zaznacza się, że jedne z nich preferują, krótsze a inne dłuższe łańcuchy hydrofobowe [59]. Ten sam autor podaje, że reakcja przyłączenia tlenu (a) jest katalizowana przez enzym oksigenazę i w wyniku powstaje pierwszorzędowy nadwodorotlenek, który jest następnie redukowany do alkoholu. W reakcji odwodorowania (c) powstaje początkowo podwójne wiązanie przy końcu łańcucha hydrofobowego, po czym następuje uwodnienie substratu do alkoholu. Są też znane dowody, że reakcja zachodzi według schematu (b). W dalszej kolejności powstają kolejno aldehyd i kwas tłuszczowy, który może ulegać biodegradacji w procesie  $\beta$  oksydacji lub innym. Swisher podaje, że w niektórych przypadkach obserwowano  $\omega$ -oksydację (dwuterminalną) zachodzącą na obu końcach łańcucha węglowodorowego lub powstawanie w trakcie procesów estrów tłuszczowych. Autor przypuszcza, że powstawanie estrów jest wynikiem reakcji pomiędzy kwasami tłuszczowymi i alkoholami lub że estry są pośrednim produktem w procesie  $\omega$ -oksydacji.



Swisher wyjaśnia także, że dwuterminalna biooksydacja zachodzi wówczas gdy, z różnych powodów hamowany jest proces  $\beta$ -oksydacji. Dalej zwraca także uwagę, że w przypadku  $\omega$ -oksydacji łańcuchów węglowodorowych zawierających od 6 do 10 węgli proces powstania alkoholi i aldehydów może być stymulowany przez obecność w komórce plazmidu OCA, który wzbudza syntezę odpowiednich enzymów. Dalszy proces utleniania alkoholi zależy następnie od obecności chromosomalnego DNA, który to umożliwia konwersję aldehydu do karboksykwasów. Swisher, powołując się na prace wielu autorów podaje, że była obserwowana także oksydacja (subterminalna) rozpoczynająca się atakiem na węgiel leżący na dalszych pozycjach w łańcuchu hydrofobowym (2, 3, 4, 5 lub na bardziej centralnej pozycji). Proponuje, by proces ten nazwać  $\psi$ -oksydacją. W wyniku biodegradacji powstaje początkowo drugorzędowy alkohol, następnie keton, ester oraz alkohol pierwszorzędowy i kwas octowy (schemat a). Znany jest też mechanizm utleniania drugorzędowych alkoholi związany z powstaniem ketonu, diketonu i końcowym powstaniem aldehydu i kwasu (schemat b).



Podstawową drogą rozkładu dla kwasów tłuszczowych zawierających prosty łańcuch alkilowy o parzystej ilości węgli jest  $\beta$ -oksydacja. W rezultacie tej reakcji łańcuch alkilowy skraca się o dwa atomy węglowe.



Reakcja rozpoczyna się (po zaktywizowaniu cząsteczki przez ATP) od dehydrogenacji i powstania wiązania nienasyconego pomiędzy węglami w położeniu  $\alpha$  i  $\beta$ . Po przyłączeniu cząsteczki wody, utworzeniu  $\beta$ -oksyketokwasu następuje utlenienie, które umożliwia przemianę grupy ketonowej do karboksylowej i powstaje kwas karboksylowy skrócony o dwa atomy węgla w łańcuchu.

Inną drogą biodegradacji alkilu jest  $\alpha$ -oksydacja. Jest to dwustopniowe utlenianie, podczas którego łańcuch węglowodorowy stopniowo skraca się o jeden węgiel. Końcowy węgiel hydrofobu przechodzi do grupy karboksylowej, po czym odszczepia się w postaci dwutlenku węgla. Proces  $\alpha$ -oksydacji ma



jednak pewne ograniczenia i może zachodzić w łańcuchach zawierających od 13 do 18 atomów C. Literatura podaje, że w przypadkach występowania w cząsteczce SPC łańcuchów rozgałęzionych, a w szczególności zawierających w części hydrofobowej w pozycji  $\beta$  grupę metylową biodegradacja nie może zachodzić na drodze  $\beta$ -oksydacji. Znane są jednak doniesienia literaturowe mówiące, że przy udziale szczepu *Micrococcus J1* udało się przeprowadzić biodegradację takiego łańcucha na drodze  $\alpha$ - i  $\beta$ -oksydacji [57].

Utlenianie grup funkcyjnych, takich jak arylova lub łańcuch wieloeterowy może odbywać się według następujących mechanizmów biochemicznych. Przykładowo przy obecności pierścienia benzenowego może dochodzić do przyłączania dwóch grup hydroksylowych i powstawania rdzenia pirokatechiny [64]. Rozszczepienie pirokatechiny lub jej pochodnej może nastąpić pomiędzy grupami hydroksylowymi w pozycji orto (rozszczenie intradiolowe) lub w pozycji meta (rozszczenie ekstradiolowe). Szlak orto inicjowany jest przez 1,2-dioksygenazę i prowadzi do powstania kwasu cis,cis-mukonowego. Kwas ten pod wpływem szeregu enzymów zostaje przekształcony poprzez bursztynylo-CoA w acetylo-CoA, który włączany jest do przemian cyklu Krebsa. Ekstradiolowe rozerwanie w pozycji meta (szlak meta) katalizowane jest przez 2,3-dioksygenazę katecholową. Szlak ten prowadzi przez semi-aldehyd 2-hydroksymukonowy lub jego analogi do aldehydu octowego i kwasu piogronowego, które włączane są również do cyklu Krebsa [57, 59, 64].

Obecny w cząsteczce SPC łańcuch wieloeterowy  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}$  też może ulegać rozkładowi wskutek działalności mikroorganizmów. Proces ten uzależniony jest od długości łańcucha. Przyjmuje się, że przy 6 do 10 spolimeryzowanych molekułach tlenu etylenu biodegradacja zachodzi szybko i to w 100%, natomiast szybkość rozkładu wyższych homologów (przy 20 i 30

molekułach tlenu etylenu) jest znacznie mniejsza [64]. Biochemiczny rozkład łańcucha wieloeterowego jest związany z obecnością i miejscem także innych grup funkcyjnych w łańcuchu. Obecność w części hydrofilowej cząsteczki SPC grup -Cl, -OH, -S-, -NH- obniża zdolności biodegradacyjne [64]. Najprostszy schemat biodegradacji łańcucha wieloeterowego przewiduje stopniowe skracanie tego łańcucha poprzez utlenianie końcowych grup do oksyetylowanych alkoholi, które następnie mogą ulegać utlenieniu do karboksykwasy [57].

Z dokonanego przeglądu literaturowego wynika, że jakkolwiek znane są zasady biodegradacji poszczególnych podstawników wchodzących w skład SPC, jak dotąd nie przedstawiono mechanizmu biodegradacji KSPC, w którym występowałyby równocześnie łańcuchy wieloeterowe i podstawniki benzylova lub tylko łańcuchy wieloeterowe przyłączone do czwartorzędowego azotu.

#### 4. CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

##### 4.1. METODYKA BADAŃ

##### 4.1.1. Badane substraty i warunki hodowli osadu czynnego

Przedmiotem badań były preparaty o nazwie firmowej Kamin R MR, Kaminox R 15 RM, Kaminox R 5 RB, Kaminox R 11 RB. R symbolizowało łańcuchy węglowodorowe od  $-C_8H_{17}$  do  $-C_{22}H_{45}$ , głównie od  $-C_{18}H_{37}$  do  $-C_{22}H_{45}$ , które pochodziły z roślinnych kwasów porafinacyjnych. Symbol RM oznaczał grupy metylowe, a RB obecność podstawników benzytowych usytuowanych przy azocie czwartorzędowym. Liczby 5, 11, 15 określały ilości spolimeryzowanych grup tlenku etylenu, które były umiejscowione przy azocie czwartorzędowym. Preparaty zostały wyprodukowane w Instytucie Ciężkiej Syntezy Organicznej "Blachownia".

Otrzymano je w wyniku reakcji amin z chlorkiem metylu lub oksyetylowanych amin z chlorkiem metylu lub benzylu, w temperaturze  $90^{\circ}C$  z udziałem alkoholu etylowego jako rozpuszczalnika. Były to maziste, nietlote substancje rozтворzone w 50 % alkoholu, w badanych stężeniach dobrze rozpuszczalne w wodzie [36-38].

Piątą testowaną substancją był związek chemicznie czysty o nazwie bromek cetylotrójmetyloamoniowy (BCTMA), wyprodukowany przez angielską firmę Berkshire.

W badaniach używano także łatwo mikrobiologicznie rozkładalnego substratu imitującego ścieki bytowo-gospodarcze, który przygotowywano zgodnie z normą [51]. Skład tego substratu

był następujący:

pepton kazeinowy .....	156 mg
bulion suchy.....	105 mg
NH Cl.....	20 mg
Na Cl.....	7 mg
Ca Cl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O.....	7.5 mg
Mg SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O.....	2 mg
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	20 mg
K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub> .....	50 mg
woda wodociągowa .....	do..1 dm <sup>3</sup>

W badaniach korzystano także z wody do rozcieńczeń pozbawionej zarówno źródła węgla, jak i azotu [22].

##### Aparatura do badań biotechnologicznych

Hodowlę drobnoustrojów prowadzono w 4 standardowych laboratoryjnych instalacjach przeznaczonych do ciągłej hodowli osadu czynnego. Pojedyncza instalacja składała się ze zbiornika wstępnego o pojemności 24 dm<sup>3</sup> przeznaczonego na dopływ, pompy perystaltycznej, reaktora o pojemności około 3 dm<sup>3</sup> (od 3.3 do 3.5), osadnika wtórnego o objętości 2 dm<sup>3</sup>, zbiornika o pojemności 24 dm<sup>3</sup> na odpływ, pompek przepływowych do napowietrzania i do wymuszania recyrkulacji osadu czynnego z osadnika wtórnego do komory napowietrzania [51].

##### Pochodzenie drobnoustrojów

Hodowlę zapoczątkowano z osadu czynnego pobranego z komory napowietrzania osiedlowej oczyszczalni ścieków bytowo-gospodarczych.

##### Hodowla osadu czynnego

Hodowlę mikroorganizmów prowadzono w czterech etapach w temperaturze  $20^{\circ}C$ . Etap 1 przewidywał zasilanie drobnoustrojów ściekami syntetycznymi przez okres około 4 tygodni. Etap 2 obejmował prowadzenie procesu adaptacji drobnoustro-



jów do wzrastających dawek KSPC w dopływie o stężeniu od 0.5 do 20.0 mg/dm<sup>3</sup> przez okres 6 tygodni. Etap 3 dotyczył dozowania syntetycznych ścieków z KSPC w stężeniu 20.0 mg/dm<sup>3</sup> przez 3 tygodnie. Ostatni, 4 etap zakładał kontynuację hodowli w warunkach, w których preparaty zawierające KSPC stanowiły główne źródło węgla i azotu dla inkubowanych mikroorganizmów. Etap ten trwał około 4 tygodni, podczas których preparat dozowano do wody do rozcieńczeń w stężeniu 20.0 mg KSPC/dm<sup>3</sup>.

Kontrola procesu obejmowała codzienne pomiary intensywności dopływających roztworów zasilających, sprawdzanie i regulowanie stężenia tlenu w komorze aeracji (do około 2 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>), usuwanie osadu nadmiernego oraz badania fizykochemiczne prób średniodobowych dopływów i odpływów z instalacji. Obejmowały one oznaczenie pH, CZT, stężenia KSPC, azotu amonowego, azotynów, azotanów. Dla osadu czynnego określano stężenie zawiesiny i biomasy drobnoustrojów oraz indeks Mohlmanna.

Do oznaczeń dodatkowych wykonywanych w 1 i 3 etapie badań (czyli przed i po procesie adaptacji) należały pomiary aktywności dehydrogenaz. Ponadto na zakończenie 3 etapu przeprowadzano spektroskopowe analizy widm IR i <sup>1</sup>H NMR, a na zakończenie 4 etapu widma <sup>1</sup>H NMR. Do analiz spektroskopowych próby odpływu pobierano, uwzględniając czas retencji w komorze aeracji i w osadniku wtórnym, po oznaczeniu stężenia KSPC.

#### 4.1.2. Oznaczenia analityczne

##### 4.1.2.1. Oznaczenia fizykochemiczne

W trakcie badań wykonywano pomiary: pH potencjometrycznie, CZT według Eckenfeldera lub jako utlenialność metodą nadmanganianową, azot amonowy kolorymetrycznie z odczynnikiem Nesslera, azotyny kolorymetrycznie z kwasem sulfanilowym i  $\alpha$ -nafityloaminą, azotany kolorymetrycznie z kwasem fenolodwusulfo-

nowym [22]. KSPC oznaczano kolorymetrycznie z błękitem disulfinowym [47], zawiesinę masy drobnoustrojów wagowo na sączkach. suchą masę organiczną po wyprażeniu w 550° C. stężenie tlenu rozpuszczonego za pomocą sondy tlenowej, indeks Mohlmanna w cylindrach miarowych o pojemności 100 cm<sup>3</sup> (ustalona wartość indeksu może być porównywana z wynikami uzyskiwanymi tylko w ten sam sposób).

##### 4.1.2.2. Oznaczenie aktywności dehydrogenaz

Aktywność dehydrogenaz oznaczano w obecności chlorku 2,-3,-5-trójfenylotetrazolowego (TTC), korzystając z metodyki zmodyfikowanej przez Mikscha [43]. Polegała ona na określaniu, każdorazowo przed przystąpieniem do pomiarów, optymalnych parametrów inkubacji drobnoustrojów, takich jak stężenie TTC (2 % roztwór TTC dozowano w zakresie od 0.1 do 1.0 cm<sup>3</sup>) i czas inkubacji (ustalany w zakresie od 10 do 45 minut) w celu uchwycenia liniowego przyrostu aktywności, wynik podawano w  $\mu\text{M TF/dm}^3 \text{ h}$  lub  $\mu\text{M TF/g sm h}$ . Wyznaczana w ten sposób wielkość obrazowała przyrost aktywności dehydrogenaz podczas inkubacji drobnoustrojów.

##### 4.1.2.3. Analiza widmowa IR i <sup>1</sup>H NMR

Analizie poddawano próby pobierane z dopływu i odpływu z komory aeracji oraz roztwory wzorcowe badanych KSPC. Objętości prób wynosiły 1.0 do 10.0 dm<sup>3</sup>. Próby poddawano trójstopniowej ekstrakcji chloroformowej, uzyskany ekstrakt zatężano pod próżnią do suchej pozostałości. Ekstrakty przeznaczone do analizy widmowej <sup>1</sup>H NMR zatężano dwustopniowo, stosując kolejno kolby o pojemności 1000 i 25 cm<sup>3</sup>. Suchą pozostałość przeznaczoną do pomiaru widma IR rozpuszczano w 10 cm<sup>3</sup> czterochlorku węgla, przeznaczoną do pomiaru widma <sup>1</sup>H NMR w 1 cm<sup>3</sup> deuterowanego chloroformu. Wymienione rozpuszczalniki przyjęte za Baleux i Caumette [6] oraz Hellmannem [20] zapewniały dobrą rozpuszczalność badanych substancji.



Widma IR wykonywano z użyciem spektrometru do podczewieni typ UR-10 firmy Carl Zeiss Jena, korzystając z nierozkładalnych kuwet wykonanych z KBr. Grubość mierzonej warstwy roztworu wynosiła 0.2 mm. Widma rejestrowano w zakresie drgań rozciągających grup  $-\text{CH}_2-$  i  $-\text{CH}_3$  od 2700 do 3200  $\text{cm}^{-1}$ . W tym zakresie widmo rozpuszczalnika pozbawione jest pasm absorpcyjnych. Intensywność pasm mierzono metodą linii podstawowej, wyrażano w jednostkach absorbancji, która zgodnie z prawem Beera jest proporcjonalna do stężenia [4]. Intensywność pasm grupy  $-\text{CH}_3$  mierzono przy 2970  $\text{cm}^{-1}$  i oznaczano jako  $\Delta A_1$  a  $-\text{CH}_2-$  przy 2930  $\text{cm}^{-1}$  i oznaczano  $\Delta A_2$ , następnie wyznaczano stosunek  $\Delta A_2/\Delta A_1$ . Widma  $^1\text{H}$  NMR określano za pomocą spektrometru  $^1\text{H}$  NMR Jeol-IMN-60 o częstotliwości 60 MHz. Pomiaru dokonywano w temperaturze 20°C wobec wzorca wewnętrznego tetrametylosilanu (TMS). Interpretację widm prowadzono zgodnie z zaleceniami literatury [4, 16, 20, 60, 64, 65].

#### 4.2. WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

##### 4.2.1. Biodegradacja bromku cetylotrójmetyloamoniowego przez drobnoustroje osadu czynnego

Wykonane we wstępnej fazie pracy badania nad adaptacją i biodegradacją bromku cetylotrójmetyloamoniowego (rys.1) przez drobnoustroje osadu czynnego miały na celu sprawdzenie poprawności przyjętej metodyki określania i interpretowania widm spektrometrycznych. Badana sól amoniowa stanowiła indywidualum chemiczne badane i opisywane w literaturze jako ulegające biodegradacji [59].

Badania rozpoczęto hodowlą drobnoustrojów osadu czynnego zasilanych łatwo rozkładalnym substratem (stanowiły go ścieki syntetyczne) o uśrednionej wielkości CZT odpowiadającej 760  $\text{mg O}_2/\text{dm}^3$  (tabela 1).

Tabela 1

Zmiany wybranych wskaźników zanieczyszczeń przed i po wprowadzeniu bromku cetylotrójmetyloamoniowego do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr etapu	CZT [ $\text{mg}/\text{dm}^3$ ]		KSPC [ $\text{mg}/\text{dm}^3$ ] dopływ	Odczyn	
	dopływ	odpływ		dopływ	odpływ
1	760	183	-	7.2	7.3
3	655	116	20.0	7.1	7.2
4	197	87	20.0	7.1	7.2

ETAP 1 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM  
 ETAP 3 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM I BROMKIEM CETYLOTRÓJMETYLOAMONIOWYM  
 ETAP 4 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO TYLKO BROMKIEM CETYLOTRÓJMETYLOAMONIOWYM

Tabela 2

Parametry biodegradacji przed i po wprowadzeniu bromku cetylotrójmetyloamoniowego do reaktora osadu czynnego

Nr** etapu	Obciążenie* substratowe osadu czyn. [g CZT/g sm d]	Stężenie* zawiesiny osadu czyn. [ $\text{g}/\text{dm}^3$ ]	Czas* napowietrzania [godz.]	Wiek* osadu czyn. [d]	Indeks* Mohl-manna [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ]
1	0.36	2.30	18	3-24	94-186
3	0.20	3.92	18	24-28	24-42
4	0.15	2.07	18	>28	19-31

\* WARTOŚĆ ŚREDNIA

\*\* JAK W TABELI 1



Tabela 3

Efekty biodegradacji przed i po wprowadzeniu bromku cetylotrójmetyloamoniowego do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr* etapu	Usunięcie [ % ]	
	CZT	KSPC
1	75	-
3	82	100
4	60	78

\* JAK W TABELI 1

Tabela 4

Przemiany związków azotowych w procesie biodegradacyjnym przed i po wprowadzeniu bromku cetylotrójmetyloamoniowego do reaktora osadu czynnego

Nr* eta- pu	Mineralne formy azotu [ mg N/dm <sup>3</sup> ]					
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ
1	4.7-15.0	8.0-23.3	0-0.4	0-6.2	0	0-1.9
3	4.0-18.0	0-1.9	0	6.3-6.9	0-0.6	12.5-15.0
4	0.9-2.0	0.4-0.9	0-0.02	0.02-0.1	0-0.9	0.9-1.4

\* JAK W TABELI 1

W trakcie 18-godzinnej napowietrzania osadu czynnego obciążanego substratem w wielkości 0.36 g CZT/ g sm d uzyskiwano 75 % biodegradację substratu (tabele 2 i 3) oraz słabą nitryfikację azotu amonowego. Azotany w odpływie osiągały maksymalne stężenie 1.9 mg N NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/dm<sup>3</sup> (tabela 4). Wyhodowany osad czynny posiadał cechy wzrostu rozproszonego. Objawiało się to wzrastającym indeksem osadowym, który pod koniec etapu osiągał 186 cm<sup>3</sup>/g (tabela 2). Pogarszanie się właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego wiązało się przede wszystkim z długim okresem napowietrzania, który był konieczny ze względu na dalszy przebieg prac. Po uzyskaniu stałej sprawności usuwania łatwo przyswajalnego substratu rozpoczęto dozowanie bromku cetylotrójmetyloamoniowego inicjując przez to 2 etap doświadczeń, trwający około 6 tygodni. Był to etap decydujący o dalszym powodzeniu pracy. Cechował się niestabilizowanym charakterem procesów zachodzących w bioreaktorze. Wyników z prowadzonych w tym okresie obserwacji nie zamieszczono. Wyniki badań dla 3 etapu prac (tabele 1, 2 i 3) wskazywały, że proces adaptacji został przeprowadzony prawidłowo i biodegradacja bromku cetylotrójmetyloamoniowego w obecności łatwo utleniającego substratu zachodziła z wysoką wydajnością. W 3 etapie pracy podczas 18-godzinnej napowietrzania z badaną substancją w stężeniu 20.0 mg KSPC/ dm<sup>3</sup>, przy obciążeniu substratowym osadu czynnego 0.20 g CZT/g sm d, zachowując długi wiek osadu dochodzący do 28 d uzyskiwano 82% usunięcie CZT oraz 100% KSPC (tabele 2 i 3). Stężenie azotanów w odpływie wynosiło od 12.5 do 15.0 mg N NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/dm<sup>3</sup> (tabela 4); wskazuje to na wysoką wydajność nitryfikacji. Nie stwierdzano ujemnego wpływu badanej substancji na proces sedymentacji osadu. Indeks Mohl-manna zmieniał się w zakresie od 29 do 42 cm<sup>3</sup>/g. Prowadzona w 4 etapie badań biodegradacja bromku cetylotrójmetyloamoniowego przy stężeniu 20.0 mg KSPC/dm<sup>3</sup> wykazała, że również w



warunkach, gdy substancja ta stanowiła jedyne źródło węgla i azotu, możliwe było uzyskiwanie 60% usunięcia CZT, 78% dla KSPC oraz nitryfikacji azotu amonowego (tabela 1, 3 i 4). Uważa się, że stwierdzana w dopływie obecność azotu amonowego oraz sporadycznie azotynów i azotanów (tabela 4) była związana z obumieraniem, a następnie utlenianiem biomasy bakteryjnej, która w znikomych ilościach występowała na ścianach zbiornika magazynującego roztwór zasilający. Na zakończenie 3 etapu badań przeprowadzono pomiary widm IR dla roztworu wzorcowego oraz dopływu i odpływu z reaktora osadu czynnego. Wartość ilorazu  $\Delta A_1 / \Delta A_2$  wskazującego zmiany ilościowe grup  $-CH_3$  i  $-CH_2$  w łańcuchu hydrofobowym zmieniła się kolejno z 1.77 na 1.49 i na 3.26 odpowiednio w roztworze wzorcowym, dopływie i odpływie (tabele 5 i 6). Wzrost ilorazu z 1.49 na 3.26 świadczył o zmniejszaniu się ilości grup metylenowych w łańcuchu węglowodorowym badanego związku. Wskazywało to na biooksydację łańcucha alkilowego. Widma  $^1H$  NMR wykonywane dla roztworu wzorcowego oraz dopływu i odpływu z reaktora pozwalały na przeprowadzenie następującej interpretacji. W widmie roztworu wzorcowego bromku cetylotrójmetyloamoniowego można było wyróżnić sygnał o przesunięciu  $\delta:0.9$  ppm (oznaczony symbolem a) oraz o przesunięciu  $\delta:1.2$  ppm (opisany jako b). Świadczyły one o obecności grup  $-CH_3$  i  $-CH_2$  należących do łańcucha alkilowego. Widoczny był też sygnał o przesunięciu  $\delta:2.3$  ppm (c) należący do protonów grup metylenowych i o przesunięciu  $\delta:3.2$  ppm należący do protonów grup metylenowych (d) i metylenowych (e) znajdujących się bezpośrednio przy atomie azotu (rys.1). Odczytany z krzywych integracji stosunek ilości protonów w łańcuchu alkilowym do ilości protonów przy azocie układał się jak 31:11 (rys.1). Odpowiadał więc rzeczywistej ilości protonów w cząsteczce bromku cetylotrójmetyloamoniowego. Oznaczało to, że widmo wykonano poprawnie.

Tabela 5

Intensywność pasm  $-CH_3$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu bromku cetylotrójmetyloamoniowego do reaktora osadu czynnego

Nr próby	Transmisja $T_1 -CH_3$ (2970) $cm^{-1}$	Absorbancja $A_1 -CH_3$ (2970) $cm^{-1}$	$\Delta A_1$
	[%]	[jedm.abs.]	[jedm.abs.]
1	87.0	0.0604	0.0336
	94.0	0.0268	
2	65.5	0.1837	0.1615
	95.0	0.0222	
3	59.0	0.2291	0.2023
	94.0	0.0268	

TRANSMISJA 94% I 95% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA  
 PRÓBA 1 ROZTWÓR WZORCOWY  
 PRÓBA 2 PRZED PROCESEM BIODEGRADACJI  
 PRÓBA 3 PO PROCESIE BIODEGRADACJI

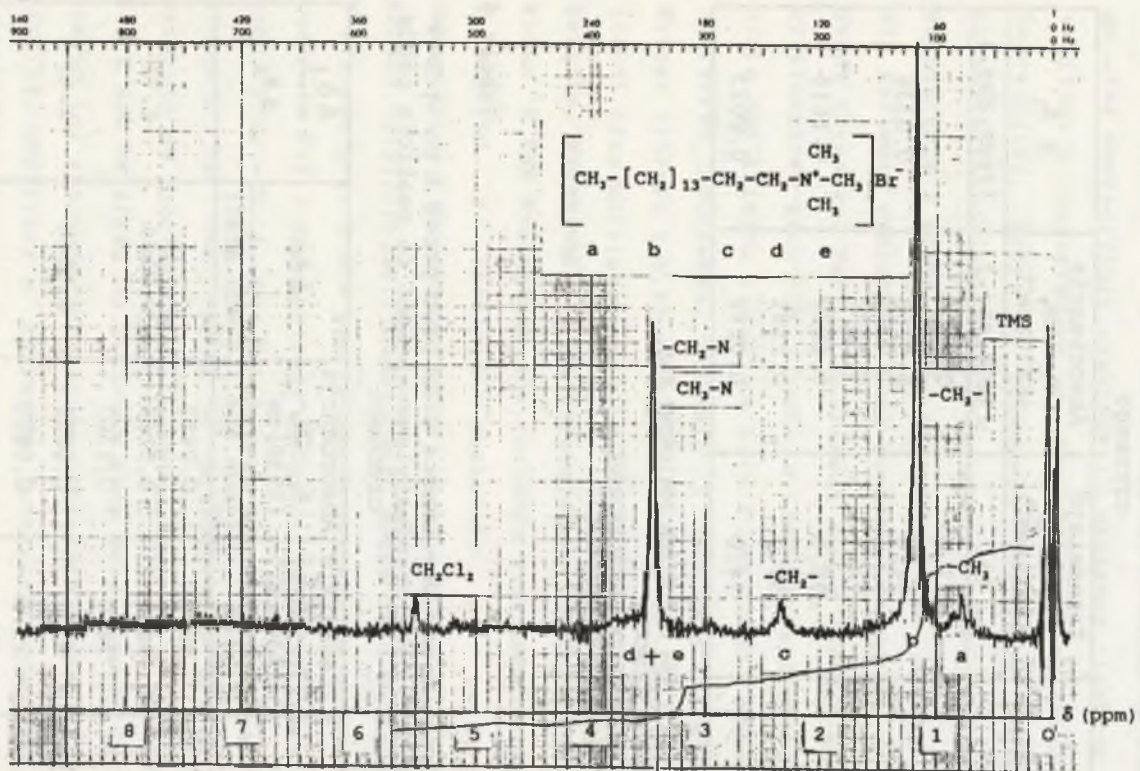
Tabela 6

Intensywność pasm  $-CH_2-$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu bromku cetylotrójmetyloamoniowego do reaktora osadu czynnego

Nr* próby	Transmisja $T_2 -CH_2-$ (2930) $cm^{-1}$	Absorbancja $A_2 -CH_2-$ (2930) $cm^{-1}$	$\Delta A_2$	$\frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$
	[%]	[jedm.abs.]	[jedm.abs.]	
1	90.0	0.0457	0.0189	1.77
	94.0	0.0268		
2	74.0	0.1307	0.1085	1.49
	95.0	0.0222		
3	81.5	0.0888	0.0620	3.26
	94.0	0.0268		

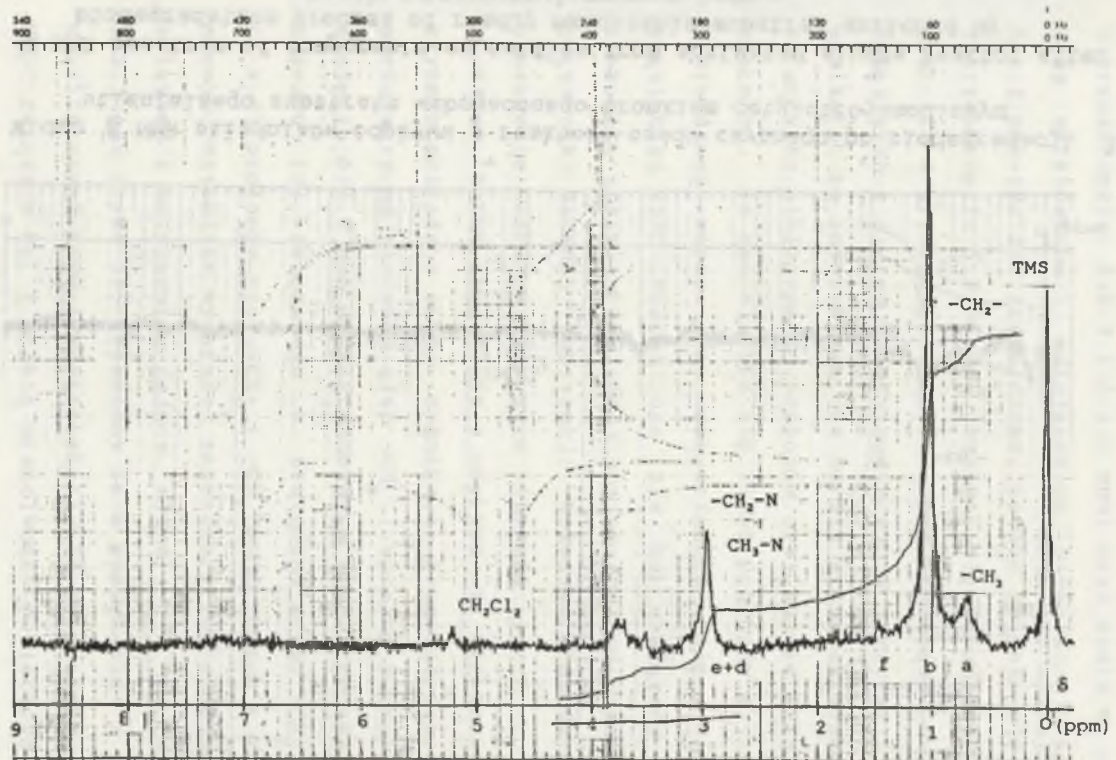
\* JAK W TABELI 5





Rys.1. Widmo  $^1\text{H}$  NMR roztworu wzorcowego zawierającego bromek cetylotrójmetyloamoniowy

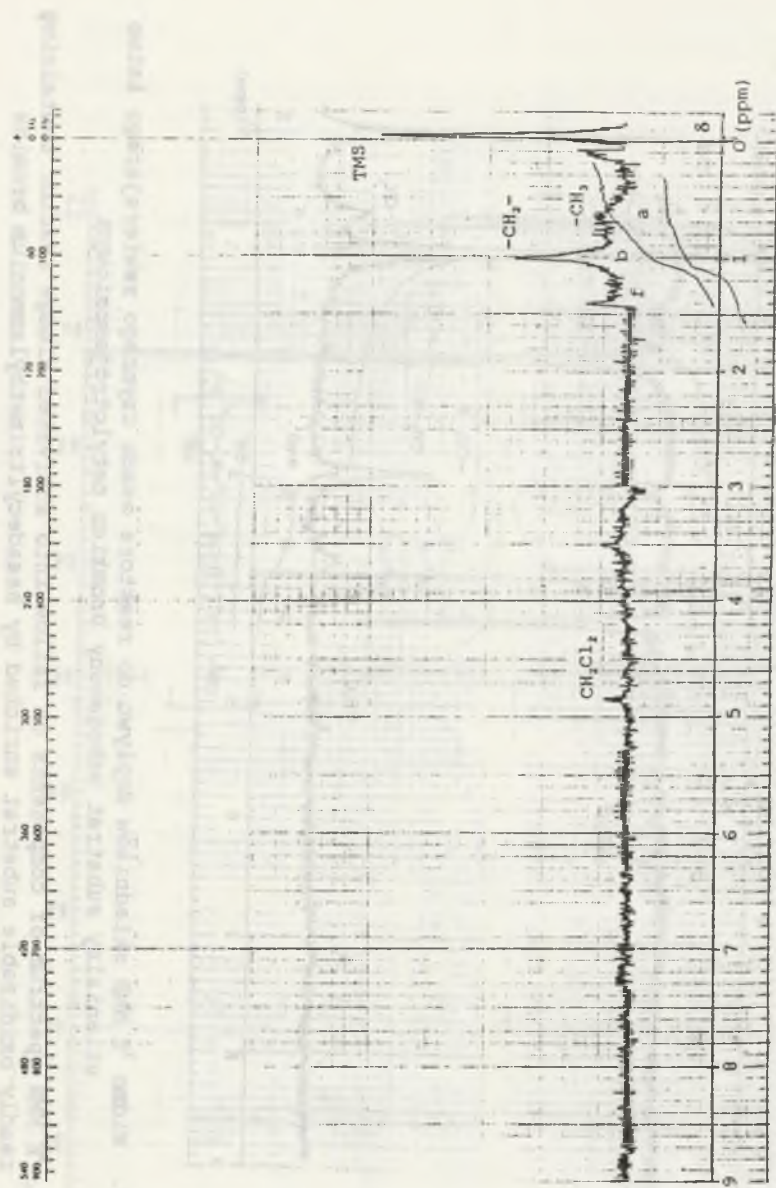
Fig.1.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of standard solution containing hexadecyltrimethylammonium bromide



Rys.2. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników dopływu do reaktora osadu czynnego zawierającego łatwo utleniały substrat wzbogacony bromkiem cetylotrójmamiowym

Fig.2.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on inflow into activated sludge reactor containing readily oxidizable substrate enriched by hexadecyltrimethylammonium bromide





Rys.3. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji łatwo utleniaelnego substratu wzbogaconego bromkiem cetylotrójamoniowym

Fig.3.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation process of readily oxidizable substrate enriched by hexadecyltrimethylammonium bromide

Widmo składników roztworu zasilającego reaktor osadu czynnego wskazywało na obecność łańcucha alkilowego (sygnał o przesunięciu  $\delta:0.9$  i  $\delta:1.2$  ppm) oraz azotu w sąsiedztwie grup metylowych i metylenowych (impuls o przesunięciu  $\delta:3.2$  ppm - rys.2). Stwierdzono, że nie pojawił się sygnał (c) o przesunięciu  $\delta:2.3$  ppm. Pojawił się natomiast słaby sygnał (f) o przesunięciu  $\delta:1.4$  ppm należący do protonów związanych z azotem w metyloaminie. Z krzywej integracji wynikało, że zmienił się (na 80:21) stosunek ilości protonów w łańcuchu alkilowym do protonów przy azocie (rys.2). Oznaczało to, że zmniejszyła się ilość protonów w cząsteczce. Stwierdzono więc, że rozpoczęła się biodegradacja cząsteczki KSPC. Proces ten nie był związany jeszcze z całkowitą utratą właściwości powierzchniowo czynnych przez cząsteczki badanej substancji. Wskazywało na to analityczne oznaczenie KSPC w dopływie (tabela 1).

Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników z odpływu z reaktora z osadem czynnym posiadało słaby sygnał o przesunięciu  $\delta:0.8$  ppm pochodzący od protonów grup  $-\text{CH}_3$  i wyraźny sygnał o przesunięciu  $\delta:1.0$  ppm od protonów grup  $-\text{CH}_2-$  (rys.3). Brak było sygnału (c) związanego z protonami grupy  $-\text{CH}_2-$  i sygnału (e + d) protonów grup  $-\text{CH}_2-$  i  $-\text{CH}_3$  połączonych z azotem amoniowym. Natomiast wyraźniej zaznaczyły swą obecność protony związane z metyloaminą dające sygnał (f) o przesunięciu  $\delta:2.3$  ppm (rys. 3). Przemiany te w powiązaniu z pomiarami analitycznymi KSPC i spektroskopii IR świadczyły, że rozkład KSPC związany był z utratą właściwości powierzchniowo czynnych cząsteczki, z biodegradacją łańcucha alkilowego, azotu amoniowego i powstawaniem metyloaminy jako produktu pośredniego.



#### 4.2.2. Biodegradacja preparatu Kamin R MR przez drobnoustroje osadu czynnego

Badania nad biodegradacją preparatu Kamin R MR miały dać odpowiedź, czy możliwy jest rozkład czwartorzędowej soli amoniowej (nie będącej indywidualnym chemicznym) posiadającej łańcuchy alkilowe o różnej ilości węgla, głównie od  $C_{18}H_{37}$  do  $C_{22}H_{45}$  i azot podstawiony trzema rodnikami  $-CH_3$  (rys.7). Analogicznie do badań poprzednich tę część 1 etapu pracy rozpoczęto od hodowli osadu czynnego, zasilając drobnoustroje łatwo rozkładalnym substratem (symulującym skład ścieków bytowo-gospodarczych).

Doprowadzając do komory aeracji substrat o średnim CZT  $427 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  (tabela 7) i poddając go 15-godzinnemu napowietrzaniu przy obciążeniu substratowym osadu czynnego  $0.29 \text{ g CZT/g sm d}$  oraz utrzymując stężenie osadu  $2.41 \text{ g/dm}^3$  (tabela 8), uzyskiwano 75% usunięcie CZT (rys.4a i tabela 9). Stwierdzano również pojawianie się w niewielkich ilościach azotu azotanowego w odpływie (rys.5c i tabela 10). Ustalając długi czas napowietrzania, co było związane z prowadzeniem w 2 etapie badań adaptacji do KSPC, można było przewidzieć, że właściwości sedymentacyjne osadu będą niekorzystne. Potwierdziły to obserwowane zmiany wielkości indeksu osadowego w zakresie  $334 \text{ do } 715 \text{ cm}^3/\text{g}$  (rys.5a i tabela 8). Po przeprowadzeniu w etapie 2 badań adaptacji drobnoustrojów do rozkładu preparatu Kamin R MR w następnym 3 etapie prac preparat ten dozowano do roztworu zasilającego tak, aby utrzymywać stężenie na poziomie  $20.0 \text{ mg KSPC/dm}^3$ . Wyniki badań podane w tabelach 7 do 10 wskazują, że proces adaptacji drobnoustrojów do preparatu Kamin R MR przebiegał prawidłowo, gdyż nadal stwierdzano wysokie średnie usunięcie CZT 73% (rys.4b i tabela 9) i 99% usunięcie KSPC (tabela 9).

Efekty te uzyskiwano przy niskim obciążeniu substratowym osadu czynnego  $0.14 \text{ g CZT /g sm d}$ , przy stosunkowo dużym stężeniu osadu na poziomie od 22 do 33 d i przy długim 20-godz. napowietrzaniu (tabela 8). CZT roztworu zasilającego wynosiło średnio  $629 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  (tabela 7). Nitryfikacja nadal zachodziła z wyższą niż w 1 etapie badań wydajnością. Stwierdzano wahania stężenia azotanów w odpływie od 3.1 do 16.9  $\text{mg N NO}_3^-/\text{dm}^3$  (rys. 5d i tabela 10). Osad czynny nadal posiadał rozproszoną strukturę, obserwowano jednak poprawę indeksu sedymentacyjnego. W większości przypadków nie przekraczał wartości  $200 \text{ cm}^3/\text{g}$  (rys.5b i tabela 8). Badania biodegradacji preparatu Kamin R MR prowadzone w 4 etapie prac, w warunkach gdy preparat stanowił główne źródło węgla i azotu, pokazały, że przy 14-godzinnym napowietrzaniu substratu o średnim CZT  $84 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  i stężeniu kationowej substancji powierzchniowo czynnej  $20.0 \text{ mg KSPC/dm}^3$  (tabela 7), przy niskim obciążeniu osadu czynnego  $0.04 \text{ g CZT/g sm d}$  możliwe było usunięcie CZT w 77% i w 90% KSPC (tabela 9). Nadal zachodziła nitryfikacja jonu  $\text{NH}_4^+$  (tabela 10). Stwierdzano dalszą poprawę właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego. Indeks osadowy Mohlmana przyjmował wartości od 90 do  $106 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Wyraźna zmiana właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego była powiązana z zatrzymywaniem i gromadzeniem się KSPC na kłaczkach osadu.

W celu wykazania zmian w aktywności fizjologicznej drobnoustrojów osadu czynnego pod wpływem dozowanego preparatu oznaczano przyrost aktywności dehydrogenaz. Pomiaru odnoszono do objętości jednostkowej bioreaktora oznaczając je symbolem  $A_v$  i wyrażając w  $\mu\text{M TF/dm}^3 \text{ h}$  lub do jednostkowej masy osadu czynnego i jako wielkość aktywności właściwej oznaczano symbolem  $A_z$  i przedstawiano w  $\mu\text{M TF/g sm h}$ . Przyrost aktywności właściwej dehydrogenaz  $A_z$  w 1 i 3 etapie badań przedstawiono

Tabela 7

Zmiany wybranych wskaźników zanieczyszczeń przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R MR do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr etapu	CZT [mg/dm <sup>3</sup> ]		KSPC [mg/dm <sup>3</sup> ] dopływ	Odczyn	
	dopływ	odpływ		dopływ	odpływ
1	427	111	-	7.2	8.2
3	629	170	20.0	8.3	8.4
4	84	27	20.0	7.9	8.2

ETAP 1 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM

ETAP 3 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM I PREPARATEM KAMIN R MR

ETAP 4 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO TYLKO PREPARATEM KAMIN R MR

Tabela 8

Parametry biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R MR do reaktora osadu czynnego

Nr** etapu	Obciążenie* substratowe osadu czyn. [g CZT/g sm d]	Stężenie* zawiesiny osadu czyn. [g/dm <sup>3</sup> ]	Czas* napowietrzania [godz.]	Wiek* osadu czyn. [d]	Indeks* Mohl-manna [cm <sup>2</sup> /g]
1	0.29	2.41	15	6-19	334-715
2	0.14	5.41	20	22-23	165-258
4	0.04	3.25	14	>33	90-106

\* WARTOŚĆ ŚREDNIA

\*\* JAK W TABELI 7

Tabela 9

Efekty biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R MR do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr* etapu	Usunięcie [ % ]	
	CZT	KSPC
1	75	-
3	73	100
4	77	90

\* JAK W TABELI 7

Tabela 10

Przemiany związków azotowych w procesie biodegradacyjnym przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R MR do reaktora osadu czynnego

Nr* etapu	Mineralne formy azotu [ mg N/dm <sup>3</sup> ]					
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ
1	0.3-16.0	0.4-20.0	0-0.1	0-0.3	0-1.27	0.5-1.3
3	1.7-12.7	3.2-10.7	śl.	śl.	0-0.4	3.1-16.9
4	0-0.2	0-2.8	śl.	śl.	0	1.2-5.6

\* JAK W TABELI 7



na rys.6 w zależności od czasu hodowli drobnoustrojów. W tabeli 11 pokazano przyrost aktywności  $A_v$  w zależności od szybkości dostarczania substratu  $O_v$  lub w zależności od szybkości usuwania substratu  $V_v$ . Natomiast w tabeli 12 przyrost aktywności  $A_z$  w zależności od szybkości dostarczania substratu  $O_z$  lub szybkości usuwania substratu  $V_z$ . Wymienione w tabelach 11 i 12 zależności można wg Mikscha z wysoką korelacją opisywać za pomocą równań liniowych [43]:

$$A_v = a_1 * O_v + b_1 \quad (1) \quad \text{lub} \quad V_v = a_2 * A_v + b_2 \quad (2)$$

$$A_z = a_3 * O_z + b_3 \quad (3) \quad \text{lub} \quad V_z = a_4 * A_z + b_4 \quad (4)$$

gdzie:

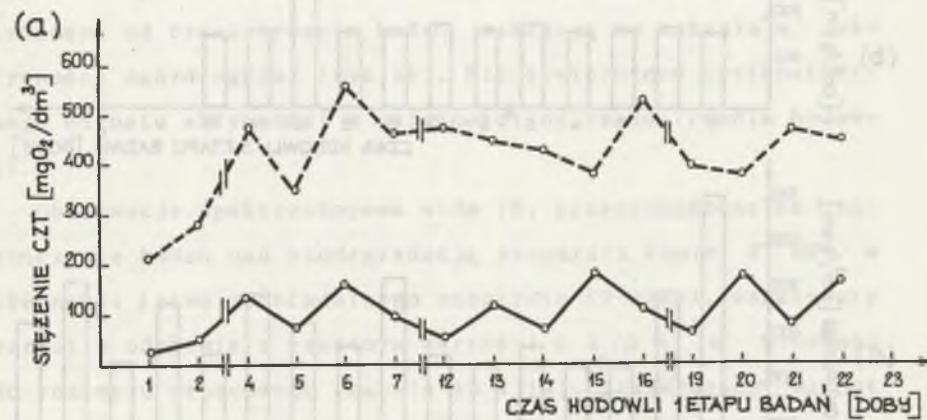
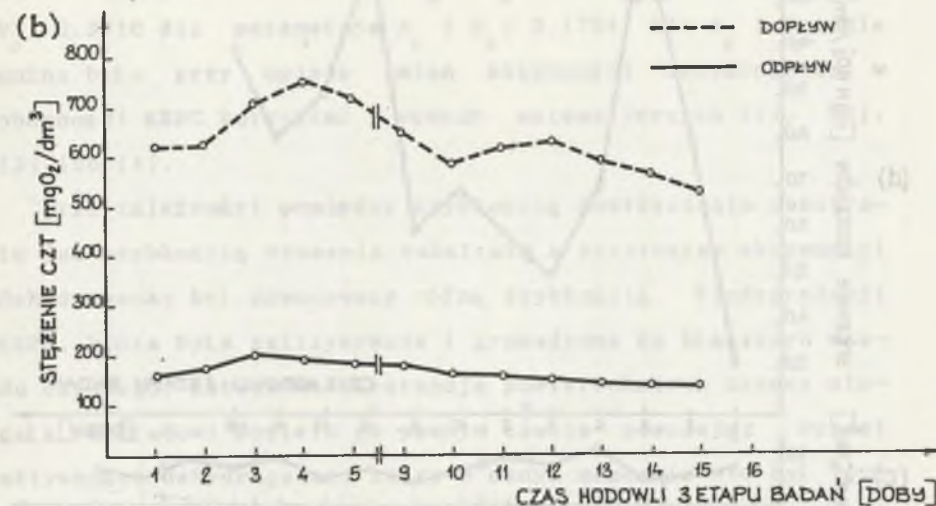
$a_1, a_2$  współczynniki związane z przyrostem aktywności dehydrogenaz, wywołane jednostkową zmianą w szybkości dostarczania substratu,

$a_3, a_4$  współczynniki związane z przyrostem aktywności dehydrogenaz, wywołane jednostkową zmianą w szybkości zużycia substratu,

$b_1 - b_4$  współczynniki związane z metodyką oznaczania aktywności i właściwościami populacji drobnoustrojów.

Przedstawianie zmian aktywności dehydrogenaz w powiązaniu z szybkością dostarczania lub usuwania substratu pozwala na wyznaczenie współczynników  $a_1 - a_4$ , które z kolei przy tych warunkach prowadzenia hodowli (wzbogacenie ścieków surowych w jedną z badanych KSPC) pozwalają sądzić o dostępności dla mikroorganizmów KSPC jako drugorzędного źródła węgla.

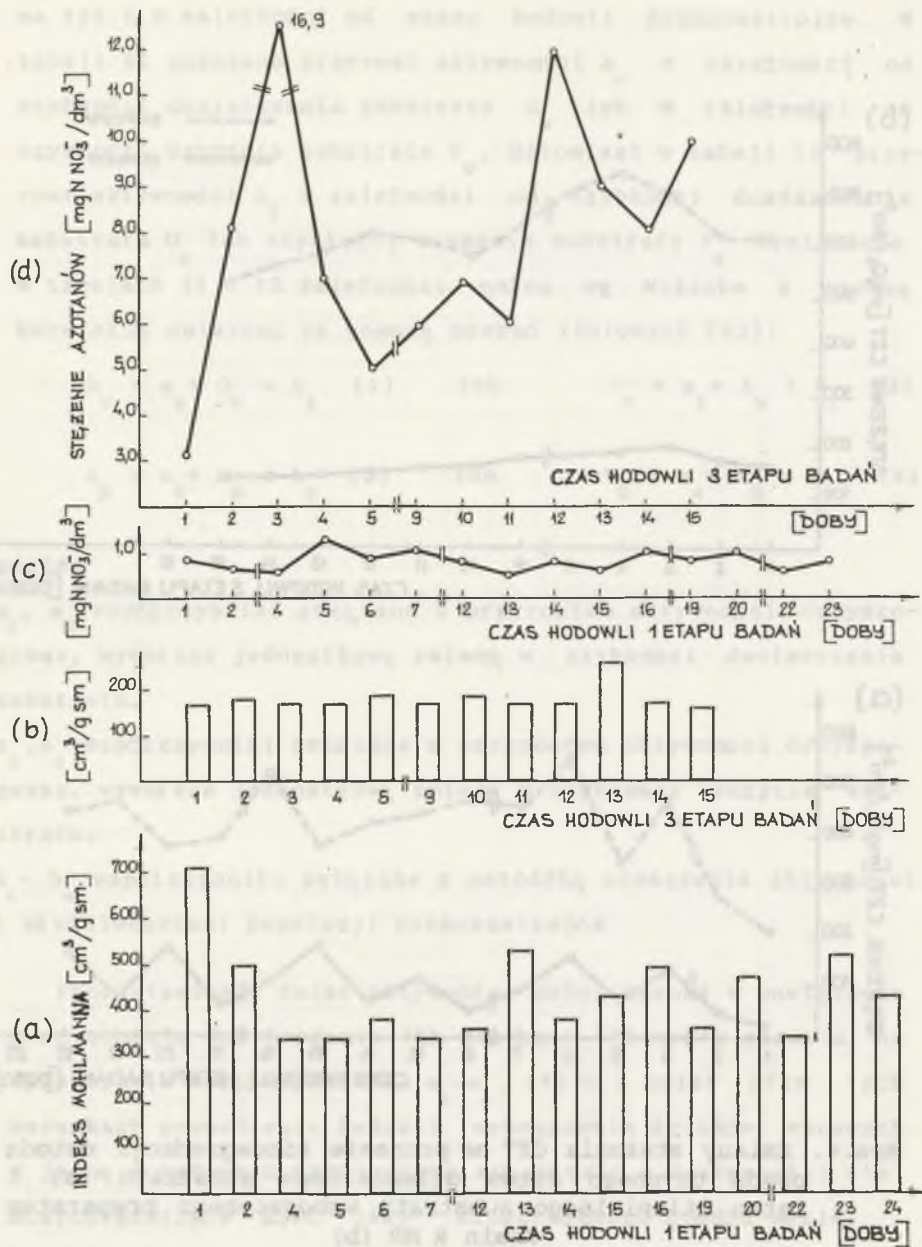
Jak pokazano w tabelach 11 i 12, uzyskiwane przyrosty aktywności dehydrogenaz nie korelowały w odpowiednio wysokim stopniu z szybkością dostarczania substratu (obciążeniem substratowym osadu czynnego) lub z szybkością usuwania substratu.



Rys.4. Zmiany stężenia CZT w procesie biodegradacji metodą osadu czynnego łatwo utlenialnego substratu (a) i łatwo utlenialnego substratu wzbogaconego preparatem Kamin R MR (b)

Fig. 4. Changes of COD concentration in biodegradation process by activated sludge method of readily oxidizable substrat (a) and readily oxidizable substrat enriched by the Kamin R MR product (b)





Rys.5. Zmiany indeksu Mohlmana i stężenia azotanów przed (a,c) i po (b,d) wprowadzeniu preparatu Kamin R MR do reaktora osadu czynnego

Fig.5. Changes of Mohlmann's index and nitrate concentration before (a,c) and after (b,d) introducing the Kamin R MR product into activated sludge reactor

Przy poziomie ufności 95% współczynnik korelacji  $r$  wynosił 0.0255 pomiędzy wartościami  $A_v$  i  $O_v$ ; 0.1277 pomiędzy  $A_v$  i  $V_v$ ; 0.3710 dla parametrów  $A_z$  i  $O_z$ ; 0.1784 dla  $A_z$  i  $V_z$ . Nie można było przy opisie zmian aktywności dehydrogenaz w obecności KSPC korzystać z równań matematycznych (1), (2), (3) lub (4).

Brak zależności pomiędzy szybkością dostarczania substratu lub szybkością usuwania substratu a przyrostem aktywności dehydrogenaz był powodowany różną szybkością biodegradacji KSPC, która była zatrzymywana i gromadzona na kłaczkach osadu czynnego. Kationowa substancja powierzchniowo czynna ulegała rozkładowi dopiero po pewnym czasie powodując wzrost aktywności dehydrogenaz, który w danym momencie nie był już związany z szybkością dostarczania lub usuwania substratu. Wyniki przyrostu aktywności dehydrogenaz przedstawione w zależności od czasu trwania badań wskazują na wahania w aktywności dehydrogenaz (rys.6b). Nie stwierdzono systematycznego wzrostu aktywności w zależności od czasu trwania hodowli.

Obserwacje spektroskopowe widm IR, przeprowadzone na zakończenie badań nad biodegradacją preparatu Kamin R MR w obecności łatwo rozkładalnego substratu (3 etap), wskazywały wzrost w odpływie z reaktora wartości  $\Delta A_1/\Delta A_2$  w stosunku do roztworu wzorcowego (tabele 13 i 14). Stwierdzony wzrost ilorazu absorbancji  $\Delta A_1/\Delta A_2$  z 1.79 do 3.77 był spowodowany zmniejszeniem się ilości grup metylenowych w hydrofobowym łańcuchu i wiązano to z częściową biodegradacją łańcucha alkilowego.

Widmo  $^1H$  NMR wykonane dla składników roztworu zasilającego reaktor pozwalało wyróżnić sygnał pochodzący od protonów grup metylenowych (oznaczony symbolem a) o przesunięciu  $\delta$ : 0.9 ppm i impuls protonów grup metylenowych (symbol b) o przesunięciu  $\delta$ : 1.3 ppm. Zidentyfikowano je jako łańcuchy



Tabela 11

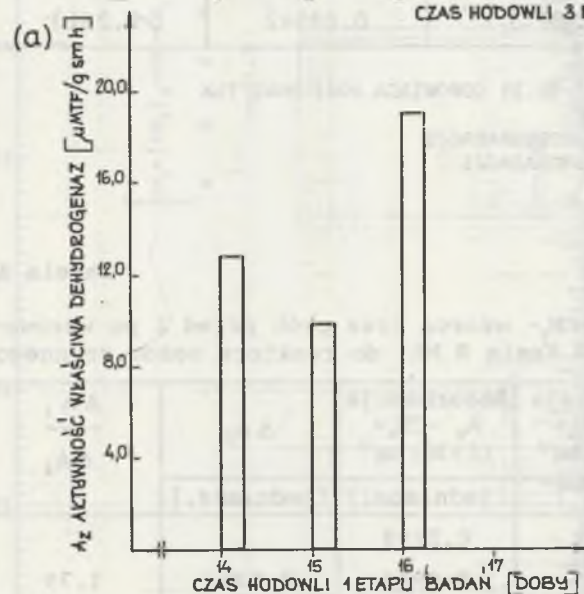
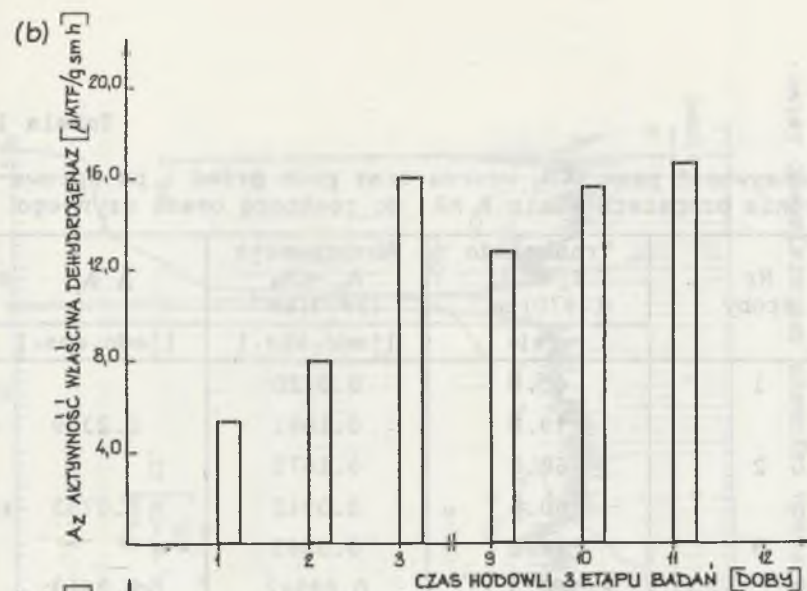
Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_v$  a szybkością dostarczania substratu  $O_v$  lub szybkością usuwania substratu  $V_v$  podczas biodegradacji łatwo utleniaelnego substratu zasilanego preparatem Kamin R MR

Aktywność dehydrogenaz $A_v$ [ $\mu\text{M TF}/\text{dm}^3\text{h}$ ]	Szybkość dostarczania substratu $O_v$ [g CZT/ $\text{dm}^3$ d]	Współ. korelacji pomiędzy $A_v$ i $O_v$	Szybkość usuwania substratu $V_v$ [g CZT/ $\text{dm}^3$ d]	Współ. korel. pomiędzy $A_v$ i $V_v$
40.0	0.80		0.58	
65.0	0.75		0.54	
11.0	0.85		0.60	
112.5	0.78	0.0255	0.59	0.1277
100.0	0.66		0.47	
72.5	0.76		0.55	

Tabela 12

Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_z$  a szybkością dostarczania substratu  $O_z$  lub szybkością usuwania substratu  $V_z$  podczas biodegradacji łatwo utleniaelnego substratu zasilanego preparatem Kamin R MR

Aktywność dehydrogenaz $A_z$ [ $\mu\text{M TF}/\text{g sm h}$ ]	Szybkość dostarczania substratu $O_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $O_z$	Szybkość usuwania substratu $V_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $V_z$
5.5	0.13		0.09	
8.2	0.13		0.09	
16.2	0.15		0.11	
12.6	0.14	0.3710	0.10	0.6052
15.9	0.13		0.09	
16.9	0.13		0.10	



Rys.6. Zmiany aktywności właściwej dehydrogenaz w procesie biodegradacji metodą osadu czynnego łatwo utleniaelnego substratu (a) i łatwo utleniaelnego substratu wzbogaconego preparatem Kamin R MR (b)

Fig.6. Changes of specific activity dehydrogenases in biodegradation process, activated sludge method, readily oxidizable substrate (a) and readily oxidizable substrate enriched by the Kamin R MR product (b)



Tabela 13

Intensywność pasm  $-\text{CH}_3$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R MR do reaktora osadu czynnego

Nr próby	Transmisja $T_1$ $-\text{CH}_3$ (2970) $\text{cm}^{-1}$	Absorbancja $A_1$ $-\text{CH}_3$ (2970) $\text{cm}^{-1}$	$\Delta A_1$ [jedn.abs.]
	[%]	[jedn.abs.]	
1	45.5	0.3420	0.2339
	79.1	0.1081	
2	68.0	0.1675	0.0733
	80.5	0.0942	
3	44.0	0.3565	0.2613
	80.3	0.09542	

TRANSMISJA 79.1%, 80.5% I 80.3% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA

PRÓBA 1 ROZTWÓR WZORCOWY

PRÓBA 2 PRZED PROCESIE BIODEGRADACJI

PRÓBA 3 PO PROCESIE BIODEGRADACJI

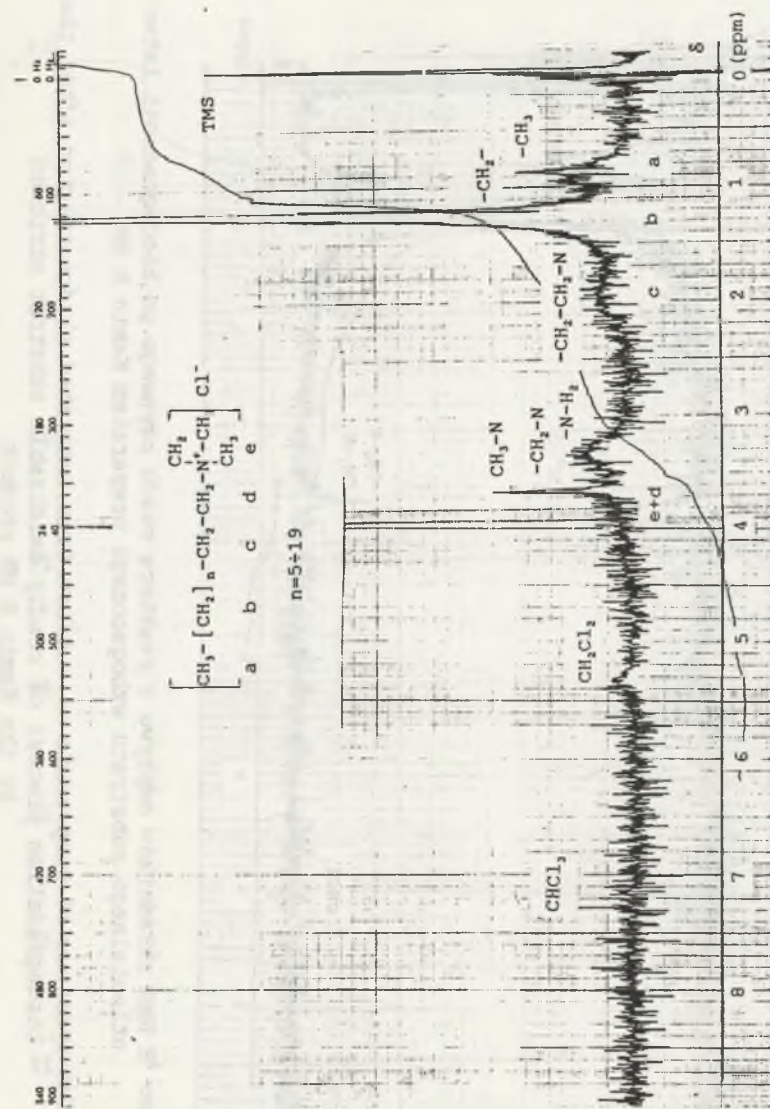
Tabela 14

Intensywność pasm  $-\text{CH}_2-$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R MR do reaktora osadu czynnego

Nr* próby	Transmisja $T_2$ $-\text{CH}_2-$ (2930) $\text{cm}^{-1}$	Absorbancja $A_2$ $-\text{CH}_2-$ (2930) $\text{cm}^{-1}$	$\Delta A_2$ [jedn.abs.]	$\frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$
	[%]	[jedn.abs.]		
1	58.9	0.2299	0.1303	1.79
	79.5	0.0996		
2	73.0	0.1367	0.0436	1.60
	80.6	0.0931		
3	68.8	0.1624	0.0693	3.77
	80.7	0.0931		

TRANSMISJA 79.5%, 80.6% I 80.7% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA

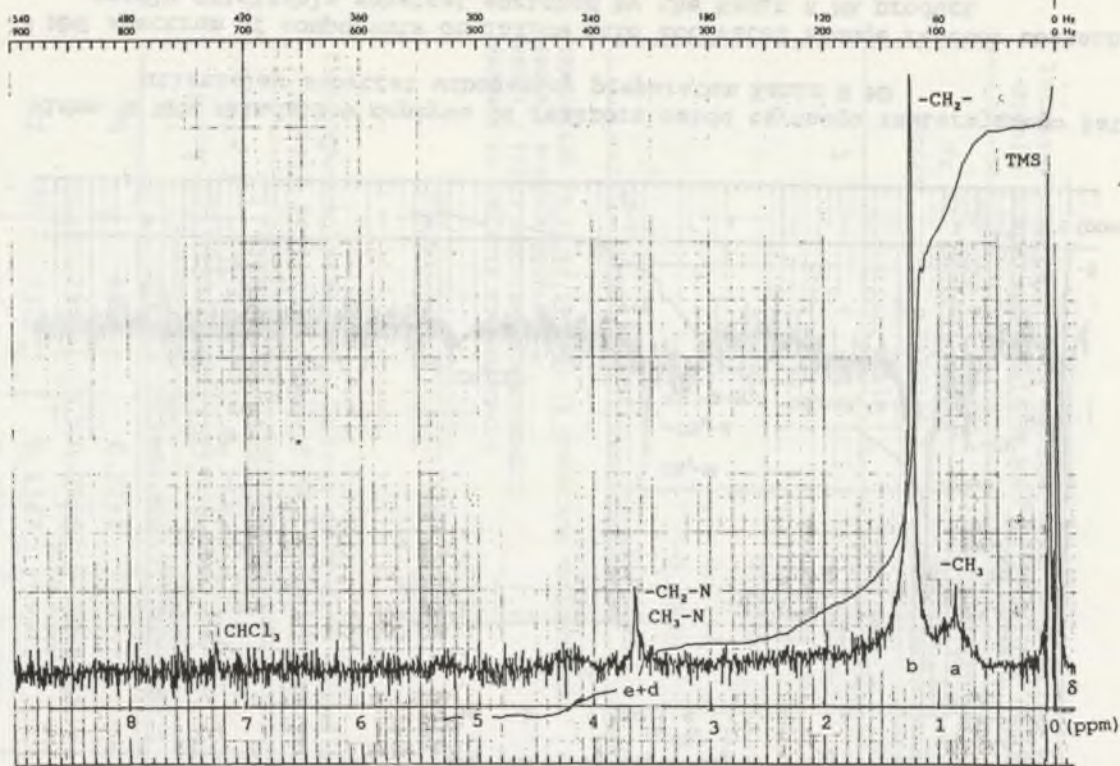
\*JAK W TABELI 13



Rys. 7. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników dopływu do reaktora osadu czynnego zawierającego łatwo utleniały substrat wzbogacony preparatem Kamin R MR

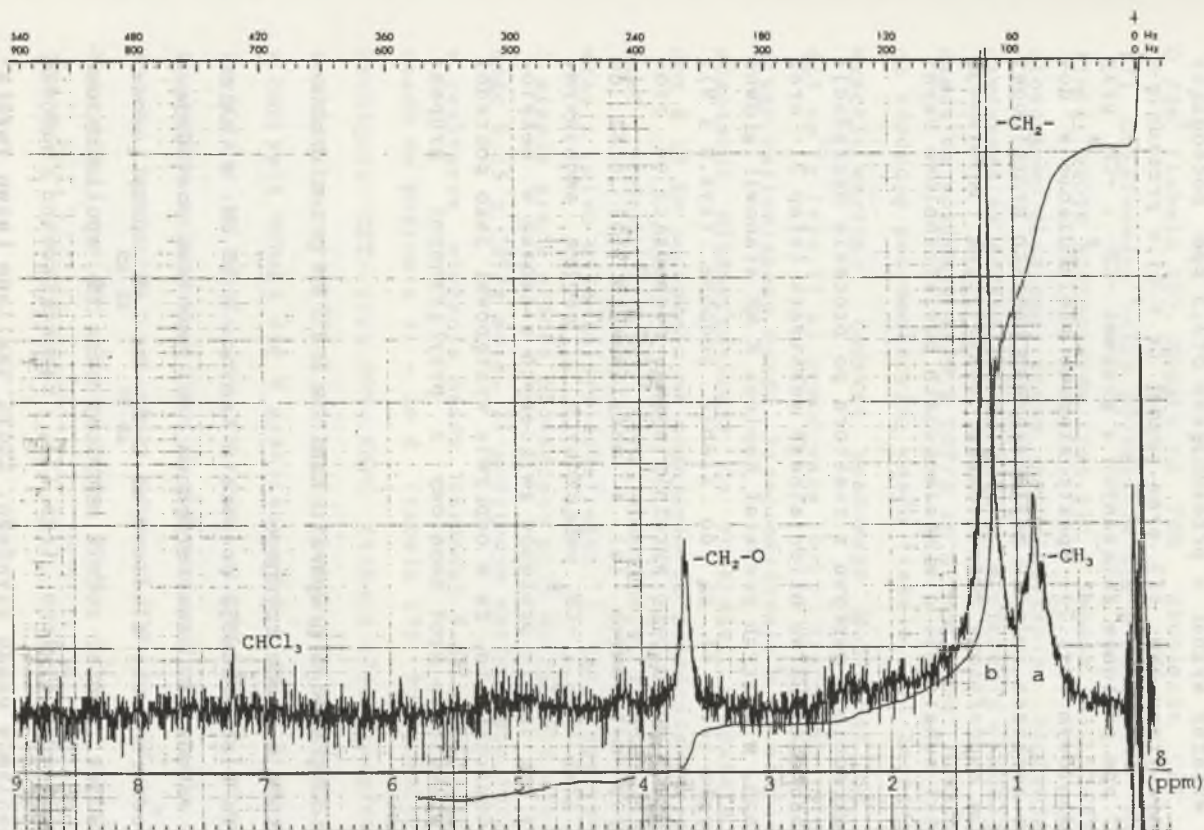
Fig. 7.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on inflow into activated sludge reactor containing readily oxidizable substrate enriched by the Kamin R MR product





Rys.8. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji łatwo utleniającego substratu wzbogaconego preparatem Kamin R MR

Fig.8.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation process of readily oxidizable substrate enriched by the Kamin R MR product



Rys.9. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji preparatu Kamin R MR

Fig.9.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation of Kamin R MR product



alkilowe. Ujawnił się też słaby impuls protonów związanych z azotem w metyloaminie o przesunięciu  $\delta: 2.0$  ppm (oznaczony jako c), wyraźny sygnał o przesunięciu  $\delta: 3.3$  ppm pochodzący od protonów grupy  $-\text{NH}_2$  (f), oraz sygnał (e + d) o przesunięciu  $\delta: 3.7$  ppm protonów związanych z grupami  $-\text{CH}_2$  i  $-\text{CH}_3$  przy azocie amoniowym (rys.7). Spektroskopowe stwierdzenie w dopływie do reaktora związku posiadającego łańcuch hydrofobowy oraz grupę hydrofilową potwierdziło analityczną informację o obecności substancji o właściwościach powierzchniowo czynnych.

Widma składników odpływu z reaktora po procesie degradacji KSPC w obecności łatwo utleniaelnego substratu (etap 3) oraz w warunkach, w których preparat Kaminox R MR stanowił główne źródło węgla (etap 4) są do siebie podobne (rys.8 i 9). W obu widmach można było wyróżnić sygnał pochodzący od protonów grup metylowych (a) i metylenowych (b) oraz od protonów grup  $-\text{CH}_2$  i  $-\text{CH}_3$  połączonych z azotem amoniowym. Nieobecny był impuls protonów związanych z azotem w metyloaminie. Oznaczało to, że w odpływie występował jako pośredni produkt utlenienia azot amoniowy z przyłączonymi grupami metylowymi.

#### 4.2.3. Biodegradacja preparatu Kaminox R 15 RM przez drobnoustroje osadu czynnego

Badania biodegradacji preparatu Kaminox R 15 RM, w skład którego wchodziła czwartorzędowa sól amoniowa posiadająca hydrofobowe łańcuchy alkilowe od  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  do  $\text{C}_{22}\text{H}_{45}$  przyłączone do azotu, jak również rodnik metylowy oraz 15 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu (rys.13), zapoczątkowano hodowlą mikroorganizmów osadu czynnego, którą zasilano łatwo rozkładalnym substratem. Stwierdzono, że zasilanie w 1 etapie badań drobnoustrojów osadu czynnego roztworem o średnim CZT  $395 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  (tabela 15) i 14-godzinne napowietrzanie (ta-

bela 16) pozwalało uzyskiwać wysokie usunięcie substratu (rys. 10a). Stwierdzano, że CZT odpływu średnio wynosiło  $96 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  (tabela 15), dawało to 76% usunięcie CZT (tabela 17). Obserwowano także pojawianie się w odpływie niewielkich ilości azotu azotanowego (rys.11c i tabela 18). Utrzymywanie stosunkowo długiego czasu napowietrzania, stężenia osadu czynnego na poziomie  $1.85 \text{ g}/\text{dm}^3$ , obciążenia substratowego osadu na poziomie  $0.36 \text{ g CZT}/\text{g sm d}$  wpływało niekorzystnie na kondycję sedymentacyjną osadu (tabela 16). Zarejestrowane wysokie wartości indeksu osadowego Mohlmanna od 414 do  $665 \text{ cm}^3/\text{g}$  (rys.11 a) powodowane były dyspersją stosunkowo długo natlenianego osadu. Przeprowadzenie w 2 etapie badań adaptacji mikroorganizmów do rozkładu preparatu Kaminox R 15 RM pozwalało na przejście do zasadniczych doświadczeń, podczas których KSPC dozowano w ilości  $20.0 \text{ mg}/\text{dm}^3$  wraz z łatwo utleniaelnym substratem. I tak w następnym już 3 etapie pracy proces prowadzono przy obciążeniu osadu czynnego  $0.15 \text{ g CZT}/\text{g sm d}$ , 21-godzinnym natlenianiu, utrzymując w reaktorze stężenie osadu czynnego  $4.67 \text{ g}/\text{dm}^3$  oraz wiek osadu na poziomie 21 - 26 d (tabela 17). Powodowało to 75% usunięcie CZT oraz 99% KSPC (tabela 17). Stwierdzano, że zachodziła nitryfikacja azotu amoniowego. Stężenie azotanów w odpływie wahało się w granicach od  $5.8$  do  $15.1 \text{ mg N NO}_3^-/\text{dm}^3$  (rys.11 d i tabela 16). W tym etapie badań obserwowano korzystne zmiany właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego. Indeks Mohlmanna zmieniał się od 179 do  $258 \text{ cm}^3/\text{g}$  (tabela 16), wartość jego tylko kilka razy przekroczyła  $200 \text{ cm}^3/\text{g}$  (rys.11 b).



Tabela 15

Zmiany wybranych wskaźników zanieczyszczeń przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 15 RM do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr etapu	CZT [mg/dm <sup>3</sup> ]		KSPC [mg/dm <sup>3</sup> ] dopływ	Odczyn	
	dopływ	odpływ		dopływ	odpływ
1	395	96	-	7.2	8.0
3	610	150	20.0	8.3	8.4
4	75	30	20.0	8.0	8.4

ETAP 1 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM  
 ETAP 3 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM I PREPARATEM KAMINOX R 15 RM  
 ETAP 4 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO TYLKO PREPARATEM KAMINOX R 15 RM

Tabela 16

Parametry biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 15 RM do reaktora osadu czynnego

Nr** etapu	Obciążenie* substratowe osadu czyn. [g CZT/g sm d]	Stężenie* zawiesiny osadu czyn. [g/dm <sup>3</sup> ]	Czas* napowietrzania [godz.]	Wiek* osadu czyn. [d]	Indeks* Mohl-manna [cm <sup>3</sup> /g]
1	0.36	1.85	14	6-11	414-665
3	0.15	4.67	21	21-28	179-358
4	0.05	3.53	21	>28	28-81

\* WARTOŚĆ ŚREDNIA  
 \*\* JAK W TABELI 15

Tabela 17

Efekty biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 15 RM do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr* etapu	Usunięcie [ % ]	
	CZT	KSPC
1	76	-
3	75	100
4	60	90

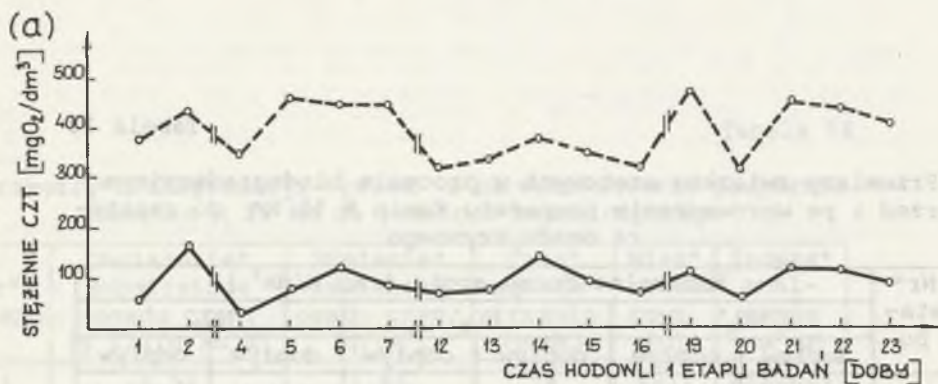
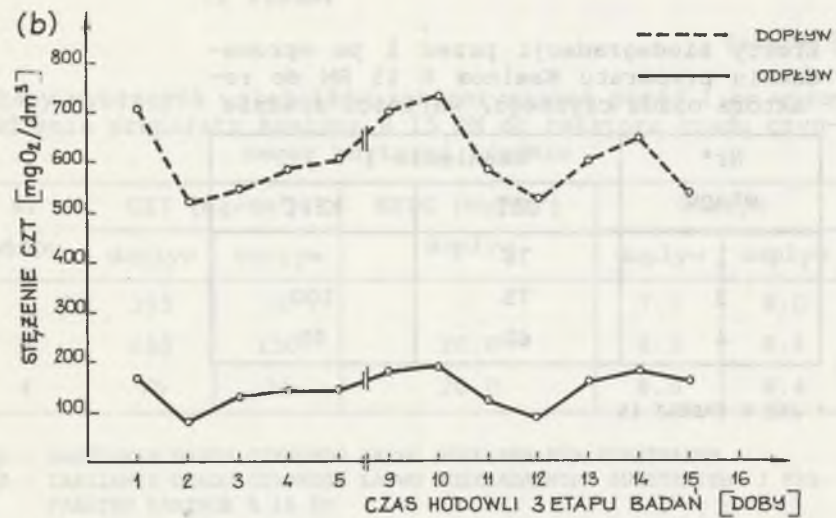
\* JAK W TABELI 15

Tabela 18

Przemiany związków azotowych w procesie biodegradacyjnym przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R 15 RM do reaktora osadu czynnego

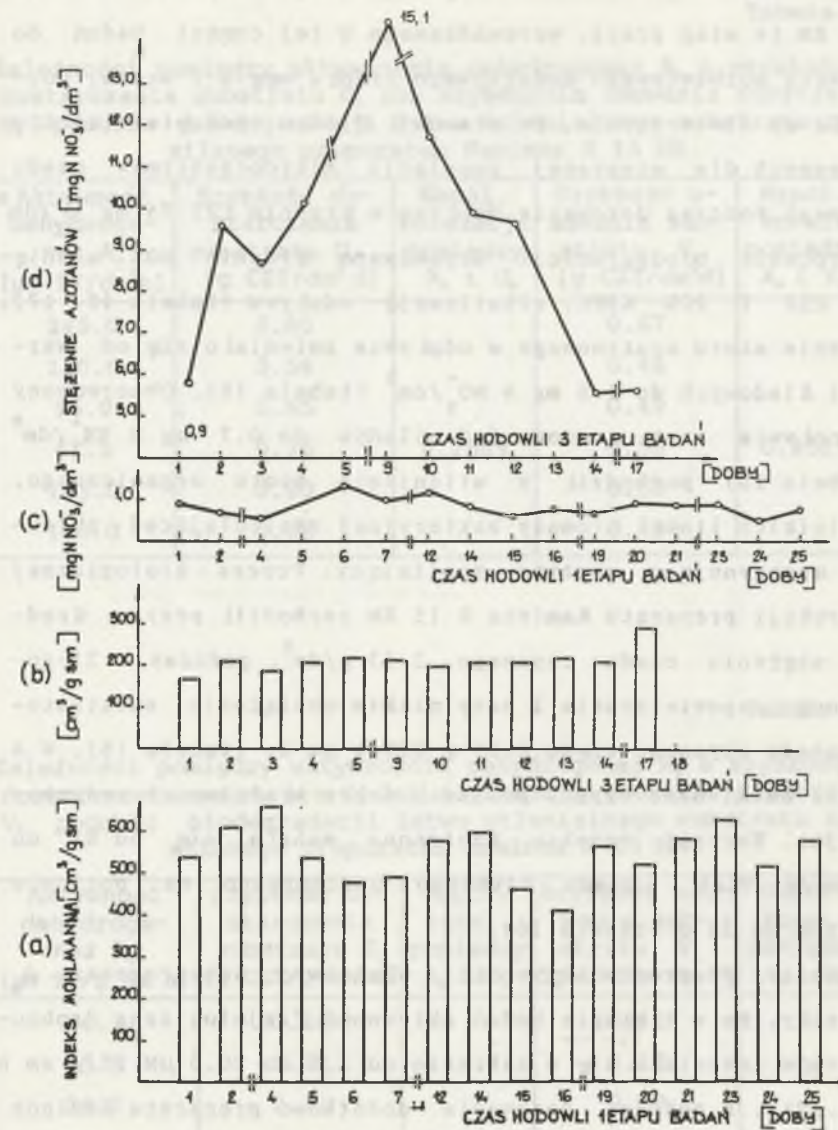
Nr* etapu	Mineralne formy azotu [ mg N/dm <sup>3</sup> ]					
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ
1	0.3-16.0	0.2-22.6	śl.	śl.	0-4.1	0.5-1.4
3	1.7-12.6	0.7-10.5	śl.	śl.	0-0.2	5.1-16.1
4	śl.-0.7	śl.-5.2	śl.	śl.	0	śl.-1.8

\* JAK W TABELI 15



Rys.10. Zmiany stężenia CZT w procesie biodegradacji metoda osadu czynnego łatwo utleniaelnego substratu (a) i łatwo utleniaelnego substratu wzbogaconego pre-paratem Kaminox R 15 RM (b)

Fig. 10. Changes of COD concentration in biodegradation process by activated sludge method of readily oxidizable substrat (a) and readily oxidizable substrat enriched by the Kaminox R 15 RM product (b)



Rys.11. Zmiany indeksu Mohlmann'a i stężenia azotanów przed (a,c) i po (b,d) wprowadzeniu preparatu Kaminox R 15 RM do reaktora osadu czynnego

Fig.11. Changes of Mohlmann's index and nitrate concentration before (a,c) and after (b,d) introducing the Kaminox R 15 RM product into activated sludge reactor



Dalsza obserwacja biochemicznej degradacji preparatu Kaminox R 15 RM (4 etap prac), wprowadzanego w tej części badań do roztworu pozbawionego dodatkowego źródła węgla i azotu, pozwalała na stwierdzenie, że stanowił źródło tych pierwiastków biogenych dla mieszanej populacji mikroorganizmów osadu czynnego. Podczas dozowania dopływu o średnim CZT  $75 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  w procesie biodegradacji uzyskiwano średnio 60% usunięcia CZT i 90% KSPC, alkalizację odpływu (tabela 15, 17). Stężenie azotu azotanowego w odpływie zmieniało się od wartości śladowych do  $1.8 \text{ mg N NO}_3^-/\text{dm}^3$  (tabela 18). Obserwowany w dopływie azot amonowy (od śladow do  $0.7 \text{ mg N NH}_4^+/\text{dm}^3$  - tabela 18) pochodził z utleniania azotu organicznego, niewielkich ilości biomasy bakteryjnej zasiedlającej zbiornik magazynujący roztwór zasilający. Proces biologicznej destrukcji preparatu Kaminox R 15 RM zachodził przy średnim stężeniu osadu czynnego  $3.53 \text{ g}/\text{dm}^3$ , podczas 21-godzinnego napowietrzania i przy niskim obciążeniu substratowym osadu czynnego rzędu  $0.05 \text{ g CZT/g sm d}$ , (tabela 16). W 4 etapie badań osad czynny posiadał dobre właściwości sedymentacyjne. Wartość indeksu Mohlmanna wahała się od 81 do  $28 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Wiek osadu czynnego utrzymywano na poziomie wyższym od 28 d (tabela 16).

Pomiary przyrostu aktywności właściwej dehydrogenaz  $A_z$  wykazały, że w 1 etapie badań aktywność fizjologiczna drobnoustrojów zmieniała się w zakresie od 2.6 do  $20.0 \mu\text{M TF/g sm h}$  (rys.12a), a podczas dozowania dodatkowo preparatu Kaminox R 15 RM (3 etap badań) zmieniała się w granicach od 9.0 do  $32.2 \mu\text{M TF/g sm h}$  (rys.12b). Świadczyło to o wysokiej aktywności fizjologicznej mikroorganizmów, które utleniały zatrzymywany przez kłaczkę osadu czynnego substrat, w tym KSPC. Próby sformułowania matematycznej zależności pomiędzy przyrostem aktywności dehydrogenaz  $A_v$  lub aktywności właściwej  $A_z$  i szybkością dostarczenia substratu  $O_v$ , lub  $O_z$  (przy

Tabela 19

Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_v$  a szybkością dostarczenia substratu  $O_v$  lub szybkością usuwania substratu  $V_v$  podczas biodegradacji łatwo utleniającego substratu zasilanego preparatem Kaminox R 15 MR

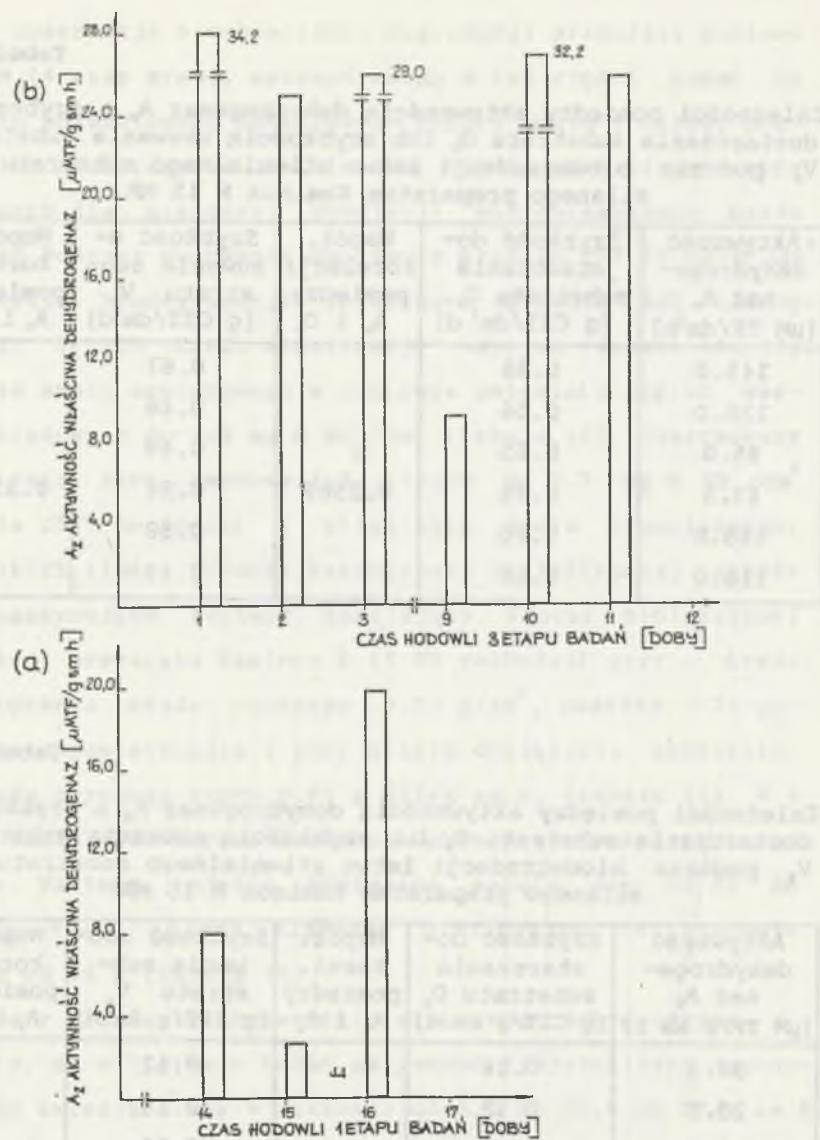
Aktywność dehydrogenaz $A_v$ [ $\mu\text{M TF}/\text{dm}^3\text{h}$ ]	Szybkość dostarczenia substratu $O_v$ [g CZT/ $\text{dm}^3\text{d}$ ]	Współ. korelacji pomiędzy $A_v$ i $O_v$	Szybkość usuwania substratu $V_v$ [g CZT/ $\text{dm}^3\text{d}$ ]	Współ. korel. pomiędzy $A_v$ i $V_v$
145.0	0.88	0.2589	0.67	0.3515
130.0	0.56		0.46	
95.0	0.65		0.49	
67.5	0.76		0.56	
145.0	0.80		0.58	
110.0	0.62		0.49	

Tabela 20

Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_z$  a szybkością dostarczenia substratu  $O_z$  lub szybkością usuwania substratu  $V_z$  podczas biodegradacji łatwo utleniającego substratu zasilanego preparatem Kaminox R 15 MR

Aktywność dehydrogenaz $A_z$ [ $\mu\text{M TF}/\text{g sm h}$ ]	Szybkość dostarczenia substratu $O_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $O_z$	Szybkość usuwania substratu $V_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $V_z$
34.3	0.16	0.0390	0.12	0.1619
25.5	0.12		0.10	
29.7	0.12		0.09	
9.0	0.16		0.12	
32.2	0.17		0.12	
26.8	0.13		0.11	





Rys.12. Zmiany aktywności właściwej dehydrogenaz w procesie biodegradacji metodą osadu czynnego łatwo utleniającego substratu (a) i łatwo utleniającego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 15 RM (b)

Fig.12. Changes of specific activity dehydrogenases in biodegradation process, activated sludge method, readily oxidizable substrate (a) and readily oxidizable substrate enriched by the Kaminox R 15 RM product (b)

obecności KSPC) wykazywały, że były one przypadkowe. Nie uzyskiwano odpowiednio wysokich współczynników korelacji przy założonym poziomie ufności 95% (tabele 19 i 20). Przykładowo pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_2$  a szybkością dostarczania substratu  $O_2$  współczynnik korelacji  $r$  wynosił 0.0390 (tabela 20). Przeprowadzona ocena szybkości zaniku substratu  $V_v$  lub  $V_z$  w powiązaniu z przyrostem aktywności dehydrogenaz  $A_v$ , lub  $A_z$  wykazała, że zależności (w przypadku obecności KSPC) były przypadkowe. Współczynniki korelacji wynosiły odpowiednio 0.3515 i 0.1619 (tabele 19 i 20).

I tym razem przeprowadzono na zakończenie 3 etapu badań nad biodegradacją preparatu Kaminox R 15 RM w obecności łatwo rozkładalnego substratu pomiary spektroskopowe widm IR roztworu wzorcowego, zasilającego reaktor oraz roztworu odpływającego z reaktora. Stwierdzono zmiany wskaźnika  $\Delta A_1/\Delta A_2$  z 1.71 dla roztworu wzorcowego na 1.55 dla dopływu i na 2.42 dla odpływu (tabele 21 i 22). Wyraźny wzrost ilorazu absorbancji  $\Delta A_1/\Delta A_2$  z 1.71 na 2.42 świadczył, że łańcuchy węglowodorowe badanej KSPC ulegały utlenieniu. Proces ten był związany ze zmniejszaniem się ilości grup metylenowych w łańcuchu hydrofobowym.

Badania widma  $^1\text{H}$  NMR dla składników roztworu zasilającego reaktor w 3 etapie badań pozwalały stwierdzić obecność silnego sygnału (a) o przesunięciu  $\delta$ : 0.9 ppm należącego do protonów grup metylowych i o przesunięciu  $\delta$ : 1.3 ppm (b) protonów grup metylenowych łańcucha alkilowego, słabiej zaznaczonego impulsu (c) o przesunięciu  $\delta$ : 1.9 ppm należącego do protonów grupy  $-\text{CH}_2-$  skupionych przy azocie, sygnału (e+d) protonów grupy  $-\text{CH}_3$  i  $-\text{CH}_2-$  znajdujących się przy azocie amoniowym oraz wyraźnie zaznaczonego sygnału (f) o przesunięciu  $\delta$ : 3.6 ppm protonów grupy  $-\text{CH}_2\text{O}$  (rys.13).



Tabela 21

Intensywność pasm  $-\text{CH}_3$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 15 RM do reaktora osadu czynnego

Nr próby	Transmisja $T_1 -\text{CH}_3$ (2970) $\text{cm}^{-1}$	Absorbancja $A_1 -\text{CH}_3$ (2970) $\text{cm}^{-1}$	$\Delta A_1$ [jedn.abs.]
	[%]	[jedn.abs.]	
1	61.1	0.2104	0.1243
	82.0	0.0861	
2	63.5	0.1972	0.1036
	80.6	0.0936	
3	48.1	0.3179	0.2210
	80.0	0.0969	

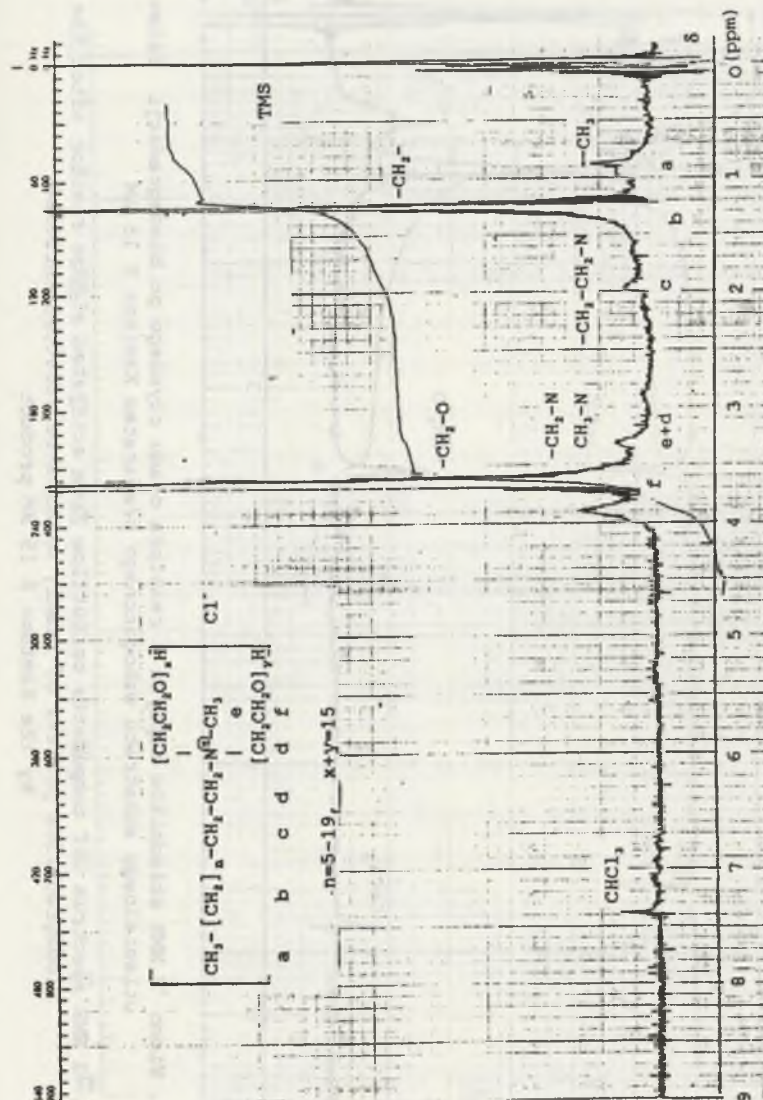
TRANSMISJA 82.0%, 80.6% I 80.0% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA  
 PRÓBA 1 ROZTWÓR WZORCOWY  
 PRÓBA 2 PRZED PROCESEM BIODEGRADACJI  
 PRÓBA 3 PO PROCESIE BIODEGRADACJI

Tabela 22

Intensywność pasm  $-\text{CH}_2-$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kamin R 15 RM reaktora osadu czynnego

Nr* próby	Transmisja $T_2 -\text{CH}_2-$ (2930) $\text{cm}^{-1}$	Absorbancja $A_2 -\text{CH}_2-$ (2930) $\text{cm}^{-1}$	$\Delta A_2$ [jedn.abs.]	$\frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$
	[%]	[jedn.abs.]		
1	69.4	0.1586	0.0725	1.71
	82.0	0.0861		
2	69.4	0.1586	0.0666	1.55
	80.2	0.0920		
3	64.8	0.1884	0.0915	2.42
	80.0	0.0969		

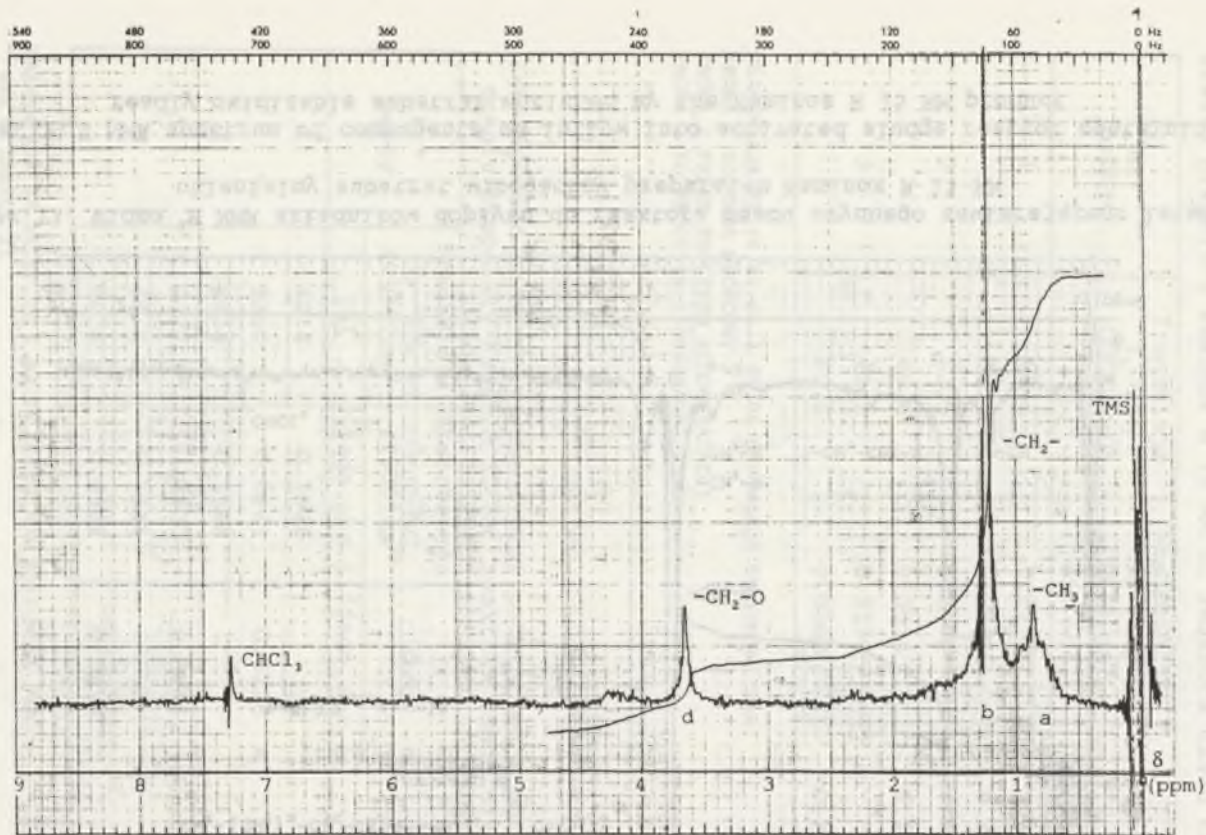
TRANSMISJA 82.0%, 80.2% I 80.0% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA  
 \* JAK W TABELI 21



Fys.13. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników dopływu do reaktora osadu czynnego zawierającego łatwo utleniały substrat wzbogacony preparatem Kaminox R 15 RM

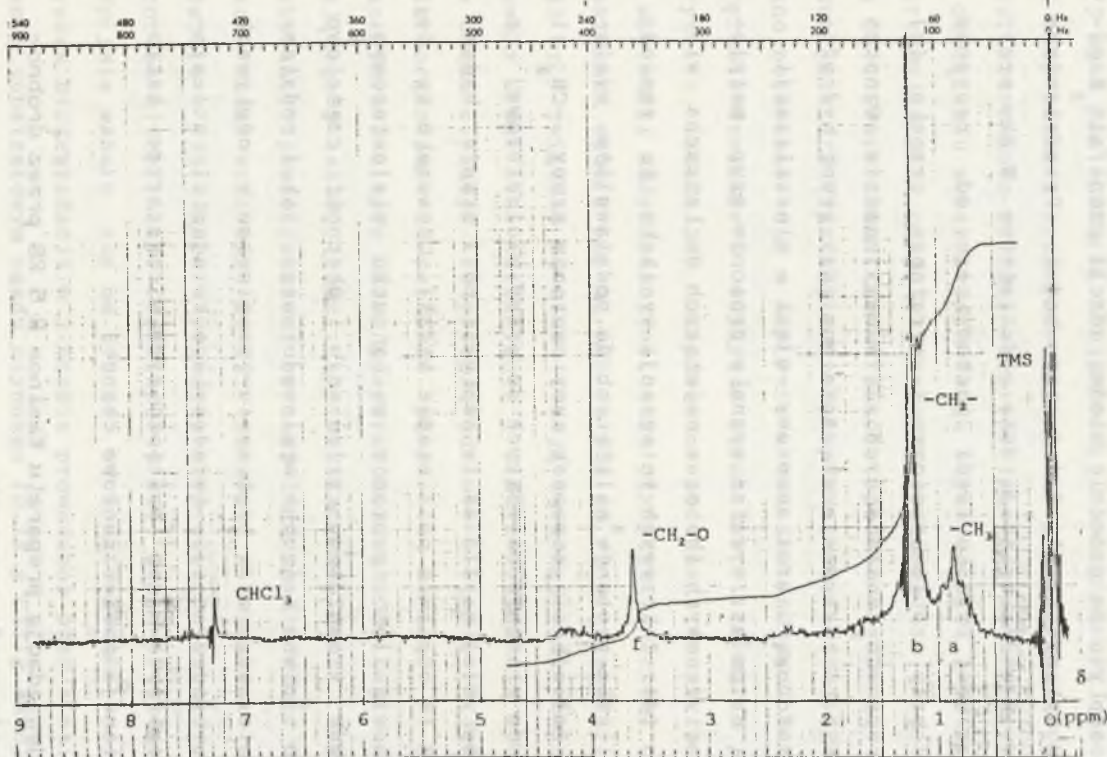
Fig.13.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on inflow into activated sludge reactor containing readily oxidizable substrate enriched by the Kaminox R 15 RM product





Rys.14. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji łatwo utleniającego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 15 RM

Fig.14.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation process of readily oxidizable substrate enriched by the Kaminox R 15 RM product



Rys.15. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji preparatu Kaminox R 15 RM

Fig.15.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation of Kaminox R 15 RM product



Oznaczało to, że badania spektralne potwierdziły obecność substancji powierzchniowo czynnej w dopływie, gdyż stwierdzono obecność hydrofobowych, jak i hydrofilowych grup funkcyjnych należących do cząsteczki KSPC. Widma  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu po procesie biodegradacji preparatu Kaminox R 15 RM wykonywano dla 3 i 4 etapu badań. Przedstawione na rys.14 i 15 widma wykazują duże podobieństwo. W obu przypadkach brak jest sygnału (e+d) pochodzącego od protonów skupionych przy azocie amoniowym i wyraźnego sygnału (c) protonów grupy  $-\text{CH}_2$  znajdujących się w metyloaminie. Oznacza to, że nastąpiło rozerwanie wiązania pomiędzy grupą hydrofilową i hydrofobową i azot amoniowy uległ mineralizacji. Widoczne są natomiast wyraźne sygnały protonów grup metyloowych (a), metylenowych (b) oraz należących do łańcucha wieloeterowego (d). Z krzywych integracji wynikało, że zmniejszyła się liczba protonów należących do podstawników wieloeterowych. Zmienił się stosunek sumy protonów grupy  $-\text{CH}_3$  i grupy  $-\text{CH}_2$  do protonów należących do grupy wieloeterowej z 80:60 (w dopływie) na 113:44 (w odpływie po 3 etapie badań) i na 117:11 (w odpływie po 4 etapie badań). Oznaczało to, że zmniejszała się ilość protonów w łańcuchu wieloeterowym, który ulegał stopniowemu utlenianiu. Obecność częściowo utlenionego zarówno łańcucha węglowodorowego, jak i podstawnika wieloeterowego oraz brak azotu amoniowego w odpływach po procesie biodegradacji świadczyła o kolejności utleniania poszczególnych grup występujących w cząsteczce kationowej substancji powierzchniowo czynnej.

#### 4.2.4. Biodegradacja preparatu Kaminox R 5 RB przez drobno-ustroje osadu czynnego

Biodegradację preparatu Kaminox R 5 RB zawierającego KSPC, posiadającą długie łańcuchy węglowodorowe, przeważnie od  $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  do  $-\text{C}_{22}\text{H}_{45}$  przyłączone do azotu amoniowego,

przy którym znajdował się podstawnik benzylový i 5 grup tlenku etylenu (rozmessezone w dwóch miejscach przy azocie) (rys.19), rozpoczęto od hodowli osadu czynnego. Hodowlę zasilano początkowo łatwo utleniającym substratem o średnim CZT  $375 \text{ mg O}_2/\text{dm}^3$  (tabela 23). Proces biodegradacji prowadzono (1 etap badań) przy przeciętnym 15-godzinym napowietrzaniu, stosunkowo niskiej zawartości  $1.96 \text{ g}/\text{dm}^3$  osadu czynnego i obciążeniu substratowym osadu czynnego  $0.32 \text{ g CZT/g sm d}$ , utrzymując wiek osadu czynnego na poziomie 6 - 14 dób (tabela 24). Stwierdzono, że w trakcie procesu uzyskiwano wysokie usunięcie CZT (rys.16) - średnio 76% (tabela 25). Zaobserwowano pojawianie się w odpływie azotu azotanowego. Maksymalne stężenie azotanów w odpływie wynosiło  $1.4 \text{ mg N NO}_3^-/\text{dm}^3$  (rys.17c, tabela 26). Obserwowane podczas 1 etapu prace właściwości sedymentacyjne osadu czynnego (wartość indeksu Mohlmanna wahała się od 400 do  $621 \text{ cm}^3/\text{g}$  - rys.17a, tabela 24) były związane ze stabilizacją tlenową osadu, którą powodowały długi czas natleniania i niskie obciążenie substratowe osadu czynnego. Po przeprowadzeniu w etapie 2 adaptacji mikroorganizmów do rozkładu preparatu Kaminox R 5 RB w następnym 3 etapie badań preparat dozowano do roztworu zasilającego w takiej ilości, aby uzyskać stężenie kationowej substancji powierzchniowo czynnej  $20.0 \text{ mg KSPC}/\text{dm}^3$ . Wyniki 3 serii badań wskazują, że CZT usuwano w wysokim stopniu, średnio w 77%, a KSPC w 94% oraz obserwowano wysoką wydajność procesu nitrifikacji (tabele 25 i 26). Stężenie azotanów w odpływie wahało się od  $8.0$  do  $16.9 \text{ mg N NO}_3^-/\text{dm}^3$  (rys.17d). Proces biodegradacji w 3 etapie prowadzono przy niskim obciążeniu substratowym osadu czynnego ( $0.18 \text{ g CZT/g sm d}$ ), utrzymując wysoką zawartość osadu czynnego  $5.04 \text{ g}/\text{dm}^3$  i wydłużając czas napowietrzania do 19 godzin (tabela 24). W 3 etapie badań indeks osadowy Mohlmanna wahał się już tylko w zakresie od  $172$  do  $314 \text{ cm}^3/\text{g}$  i rzadko przekraczał  $200 \text{ cm}^3/\text{g}$  (rys.17b).



Tabela 23

Zmiany wybranych wskaźników zanieczyszczeń przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 5 RB do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr etapu	CZT [mg/dm <sup>3</sup> ]		KSPC [mg/dm <sup>3</sup> ] dopływ	Odczyn	
	dopływ	odpływ		dopływ	odpływ
1	375	90	-	7.5	8.1
3	727	143	20.0	8.3	8.5
4	126	28	20.0	7.9	7.5

ETAP 1 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM  
 ETAP 2 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM I  
 PREPARATEM KAMINOX R 5 RB  
 ETAP 4 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO TYLKO PREPARATEM KAMINOX R 5 RB

Tabela 24

Parametry biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 5 RB do reaktora osadu czynnego

Nr** etapu	Obciążenie* substratowe osadu czyn. [g CZT/g sm d]	Stężenie* zawiesiny osadu czyn. [g/dm <sup>3</sup> ]	Czas* napowietrzania [godz.]	Wiek* osadu czyn. [d]	Indeks* Mohl-manna [cm <sup>3</sup> /g]
1	0.32	1.96	15	6-14	400-621
3	0.18	5.04	19	10-25	172-314
4	0.10	2.41	13	>25	18-23

\* WARTOŚĆ ŚREDNIA

\*\* JAK W TABELI 23

Tabela 25

Efekty biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 5 RB do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr* etapu	Usunięcie [ % ]	
	CZT	KSPC
1	76	-
3	77	94
4	82	94

\* JAK W TABELI 23

Tabela 26

Przemiany związków azotowych w procesie biodegradacyjnym przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 5 RB do reaktora osadu czynnego

Nr* etapu	Mineralne formy azotu [ mg N/dm <sup>3</sup> ]					
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ
1	1.2-13.3	4.0-16.7	0-0.03	0-1.6	0-0.5	0.1-1.4
3	4.3-13.0	3.0-19.7	0-0.06	0-0.1	0-0.9	5.3-16.9
4	śl.-0.4	śl.-2.9	0-0.02	śl.	0	2.3-13.2

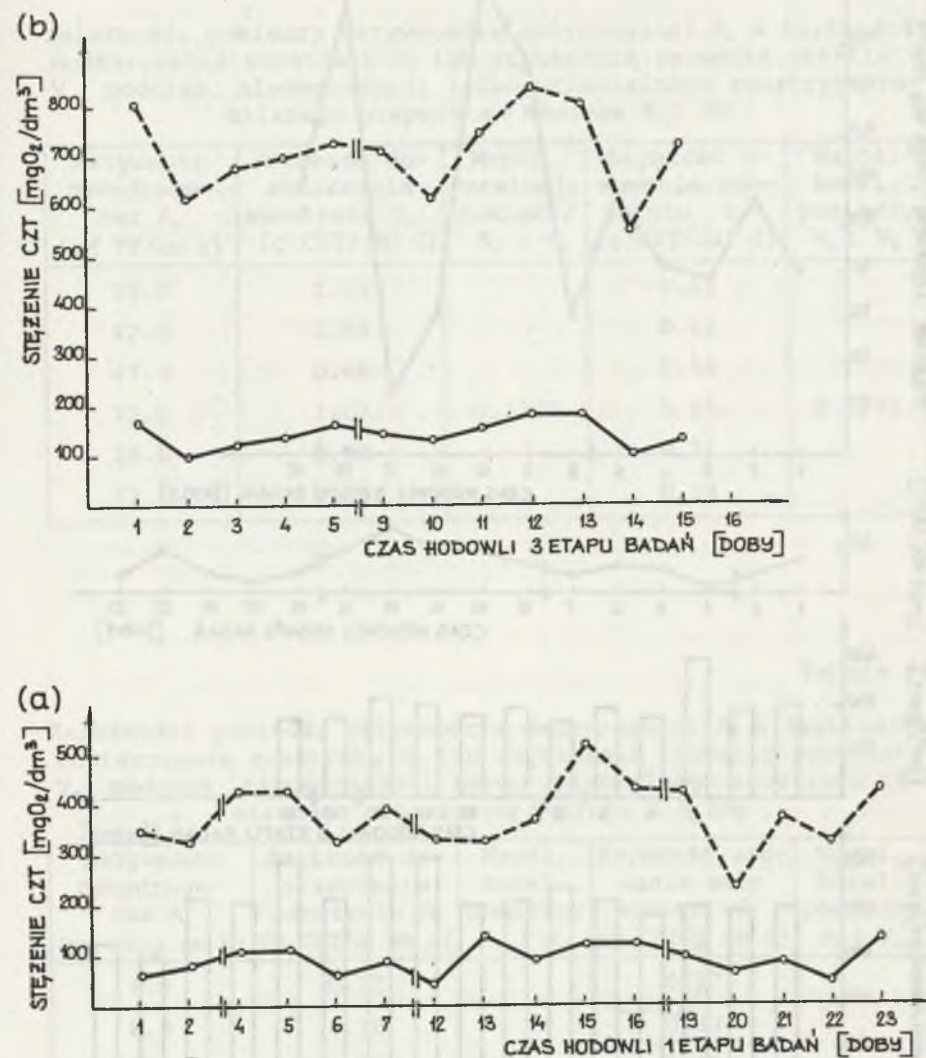
\* JAK W TABELI 23



Badania biodegradacji w 4 etapie prac prowadzono tak, aby preparat Kaminox R 5 RB stanowił główne źródło węgla i azotu dla inkubowanych mikroorganizmów. Biochemiczne utlenianie preparatu prowadzono przy niskim obciążeniu substratowym osadu czynnego 0.10 g CZT/g sm d, 13-godzinnym napowietrzaniu i przy stężeniu osadu czynnego 2.41 g/dm<sup>3</sup>.

Stwierdzano wysokie 82% usunięcie CZT i 94% KSPC oraz wysoką wydajność procesu nitryfikacji (tabele 24, 25 i 26). Pod koniec 4 etapu badań w odpływie wykrywano 13.2 mg N NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/dm<sup>3</sup> (tabela 26). Zaobserwowano obniżenie odczynu przeciętnie z 7.9 w dopływie do 7.5 w odpływie (tabela 23), które było związane z pojawianiem się w odpływie produktów o charakterze kwaśnym. Stwierdzono wyraźne zmiany własności sedymentacyjnych osadu czynnego. Indeks Mohlmanna wahał się od 18 do 23 cm<sup>3</sup>/g (tabela 24). Zmiany indeksu były powiązane z gromadzeniem się KSPC na skupiskach osadu czynnego.

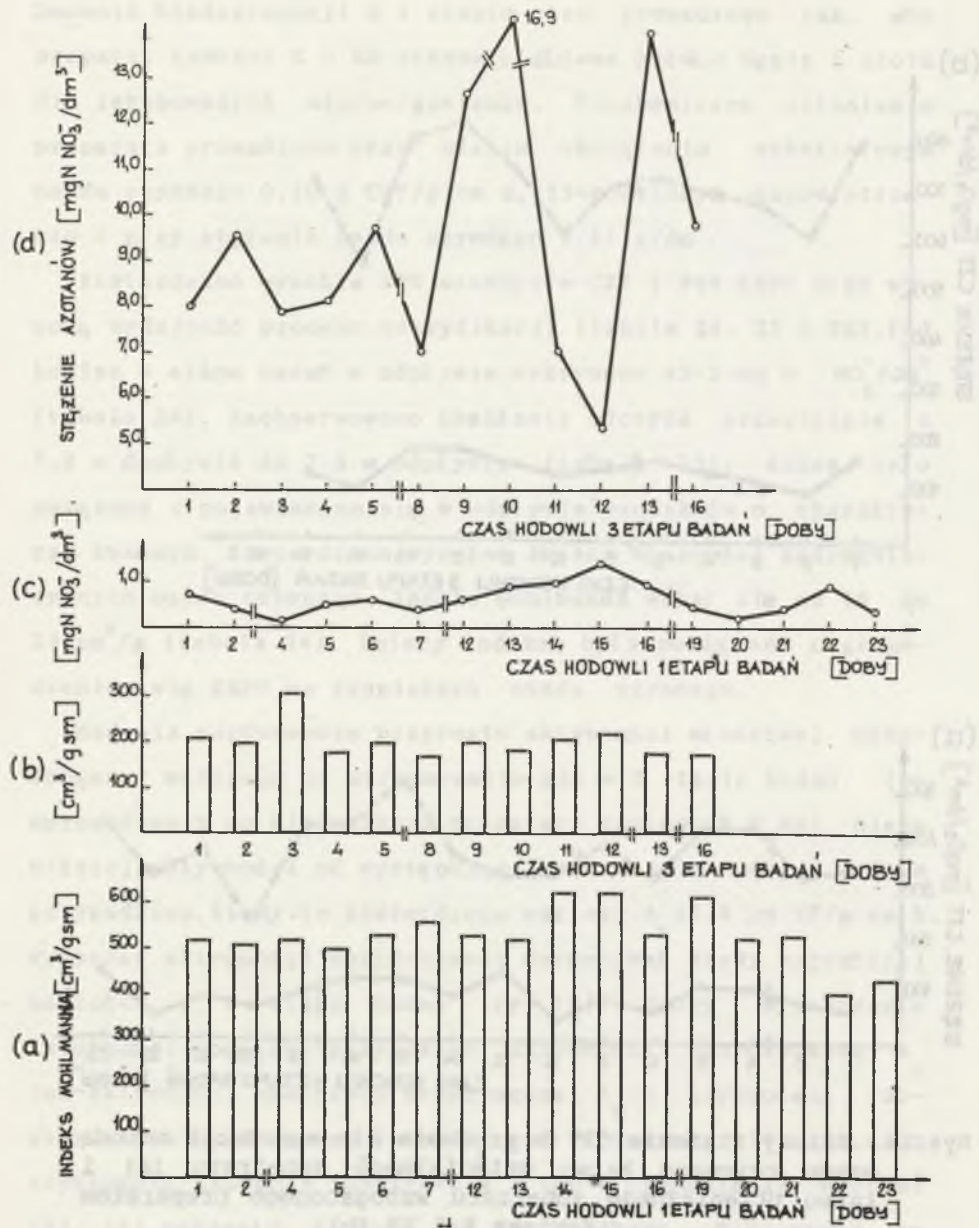
Badania porównawcze przyrostu aktywności właściwej dehydrogenaz wskazują na utrzymywanie się w 3 etapie badań (po wprowadzeniu do bioreaktora preparatu Kaminox R 5 RB) nieco niższej aktywności od występującej w 1 etapie poza jednym przypadkiem, kiedy to stwierdzono wartość  $A_z$  14.4 μM TF/g sm h. Przyrost aktywności dehydrogenaz dorównywał wtedy najwyższej wartości z 1 etapu badań (rys.18). Próby wyznaczenia zależności pomiędzy przyrostem aktywności dehydrogenaz  $A_v$  lub aktywności właściwej dehydrogenaz  $A_z$  a szybkością dostarczania substratu  $O_v$ , lub  $O_z$  według formuły (1), (3), albo szybkością usuwania substratu  $V_v$ , lub  $V_z$  zgodnie ze wzorami (2), (4) pokazały, że była ona przypadkowa. Wskazywały na to niskie współczynniki korelacji  $r$ , które wynosiły 0.1269, 0.3394, 0.1298 i 0.3455 (tabela 27 i 28). Podobnie jak w omawianych już przypadkach przyczyną braku korelacji pomiędzy przyrostem aktywności dehydrogenaz a szybkością dostarczania lub usuwania substratu, przy obecności KSPC,



Rys.16. Zmiany stężenia CZT w procesie biodegradacji metodą osadu czynnego łatwo utleniającego substratu (a) i łatwo utleniającego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 5 RB (b)

Fig. 16. Changes of COD concentration in biodegradation process by activated sludge method of readily oxidizable substrate (a) and readily oxidizable substrate enriched by the Kaminox R 5 RB product (b)





Rys.17. Zmiany indeksu Mohlmann'a i stężenia azotanów przed (a,c) i po (b,d) wprowadzeniu preparatu Kaminox R 5 RB do reaktora osadu czynnego

Fig.17. Changes of Mohlmann's index and nitrate concentration before (a,c) and after (b,d) introducing the Kaminox R 5 RB product into activated sludge reactor

Tabela 27

Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_v$  a szybkością dostarczania substratu  $O_v$  lub szybkością usuwania substratu  $V_v$  podczas biodegradacji łatwo utleniaelnego substratu zasilanego preparatem Kaminox R 5 RB

Aktywność dehydrogenaz $A_v$ [ $\mu$ M TF/dm <sup>3</sup> h]	Szybkość dostarczania substratu $O_v$ [g CZT/dm <sup>3</sup> d]	Współ. korelacji pomiędzy $A_v$ i $O_v$	Szybkość usuwania substratu $V_v$ [g CZT/dm <sup>3</sup> d]	Współ. korel. pomiędzy $A_v$ i $V_v$
30.0	1.04		0.83	
42.5	0.80		0.66	
47.5	0.68		0.56	
72.5	1.07	0.1269	0.85	0.1298
35.0	0.90		0.71	
27.5	1.18		0.94	

Tabela 28

Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_z$  a szybkością dostarczania substratu  $O_z$  lub szybkością usuwania substratu  $V_z$  podczas biodegradacji łatwo utleniaelnego substratu zasilanego preparatem Kaminox R 5 RB

Aktywność dehydrogenaz $A_z$ [ $\mu$ M TF/g sm h]	Szybkość dostarczania substratu $O_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $O_z$	Szybkość usuwania substratu $V_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $V_z$
6.9	0.22		0.17	
8.5	0.16		0.13	
8.3	0.22		0.18	
14.5	0.18	0.3394	0.14	0.3455
8.7	0.16		0.12	
7.8	0.20		0.16	



było szybkie zanikanie KSPC ze środowiska (powodowane zatrzymywaniem na kłaczkach osadu czynnego). Proces zanikania KSPC (i tym samym obniżania się stężenia CZT w odpływie) nie szedł w parze z szybkością biodegradacji KSPC przez mikroorganizmy skupione w kłaczkach osadu czynnego.

Pomiary spektroskopowe widm IR wykonywane na zakończenie 3 etapu badań wskazały na niewielkie zmiany w intensywności pasm  $-CH_3$  i  $-CH_2-$  w trakcie procesu biodegradacji, co sprawia trudności przy prowadzeniu interpretacji. Widma IR wykazały, że stosunek absorbancji  $\Delta A_1 / \Delta A_2$  przyjmował wartości 1.25, 1.08 i 1.50 odpowiednio dla preparatu Kaminox R 5 RB, dopływu i odpływu (tabele 29 i 30). Zaobserwowane niewielkie zmiany absorbancji  $\Delta A_1 / \Delta A_2$  z wartości 1.25 do 1.50 nie mogą świadczyć o zmniejszaniu się ilości grup  $-CH_2-$  w hydrofobie.

Badania spektroskopowe widma  $^1H$  NMR wskazywały na występowanie w roztworze zasilającym hodowlę osadu czynnego (3 etap badań) grup funkcyjnych związanych z cząsteczką KSPC. Silny sygnał (a) o przesunięciu  $\delta:0.9$  ppm jak i impuls (b) o przesunięciu  $\delta:1.3$  ppm należał odpowiednio do protonów grup metylowych i metylenowych związanych z łańcuchem węglowodorowym. Słaby impuls (c) o przesunięciu  $\delta:1.9$  ppm pochodzący od protonów był związany z azotem w metyloaminie, a sygnał (e) o przesunięciu  $\delta:3.6$  ppm pochodził od protonów grupy  $-CH_2-O-$ . Następnie stwierdzono obecność sygnału (f) pochodzącego od protonów grup metylenowych związanych z pierścieniem benzenowym, a także sygnału (g) o przesunięciu  $\delta:7.5$  ppm, protonów grupy benzenowej (rys.19). Nie stwierdzono obecności sygnału pochodzącego od protonów grup metylenowych związanych z azotem amoniowym (rys.19).

Stwierdzono, że obydwa widma  $^1H$  NMR składników odpływów, wykonane na zakończenie 3 i 4 etapu badań, były do siebie podobne (rys.20 i 21). Wskazywały na brak sygnału (c) pochodzą-

Tabela 29

Intensywność pasm  $-CH_3$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 5 RB do reaktora osadu czynnego

Nr próby	Transmisja $T_1 -CH_3$ (2970) $cm^{-1}$	Absorbancja $A_1 -CH_3$ (2970) $cm^{-1}$	$\Delta A_1$
	[%]	[jedn.abs.]	[jedn.abs.]
1	71.1	0.1481	0.0635
	82.3	0.0846	
2	62.3	0.2034	0.1082
	80.3	0.0952	
3	31.5	0.5017	0.4048
	80.0	0.0969	

TRANSMISJA 82.3%, 80.3% I 80.0% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA  
 PRÓBA 1 ROZTWÓR WZORCOWY  
 PRÓBA 2 PRZED PROCESEM BIODEGRADACJI  
 PRÓBA 3 PO PROCESIE BIODEGRADACJI

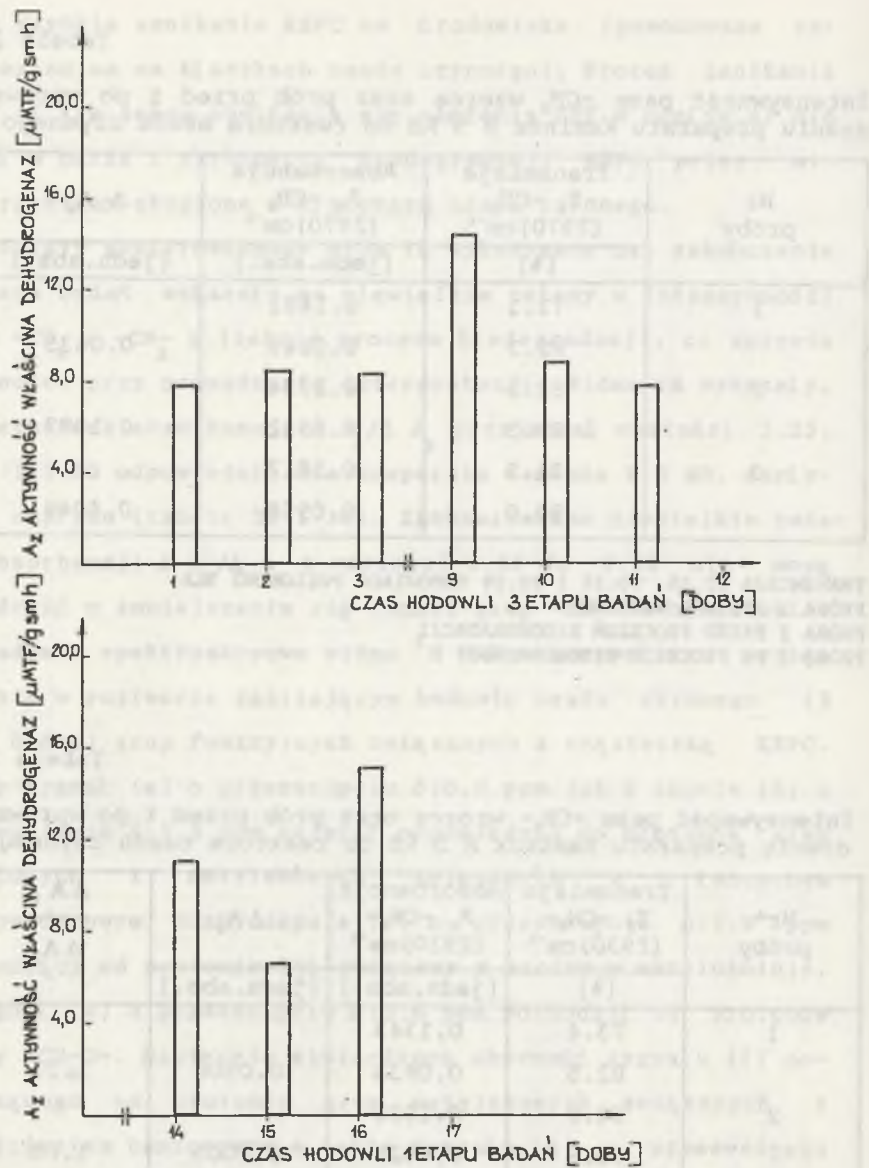
Tabela 30

Intensywność pasm  $-CH_2-$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 5 RB do reaktora osadu czynnego

Nr* próby	Transmisja $T_2 -CH_2-$ (2930) $cm^{-1}$	Absorbancja $A_2 -CH_2-$ (2930) $cm^{-1}$	$\Delta A_2$	$\frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$
	[%]	[jedn.abs.]	[jedn.abs.]	
1	73.4	0.1343	0.0508	1.25
	82.5	0.0835		
2	64.2	0.1925	0.1005	1.08
	80.9	0.0920		
3	43.0	0.3665	0.2691	1.50
	79.9	0.0974		

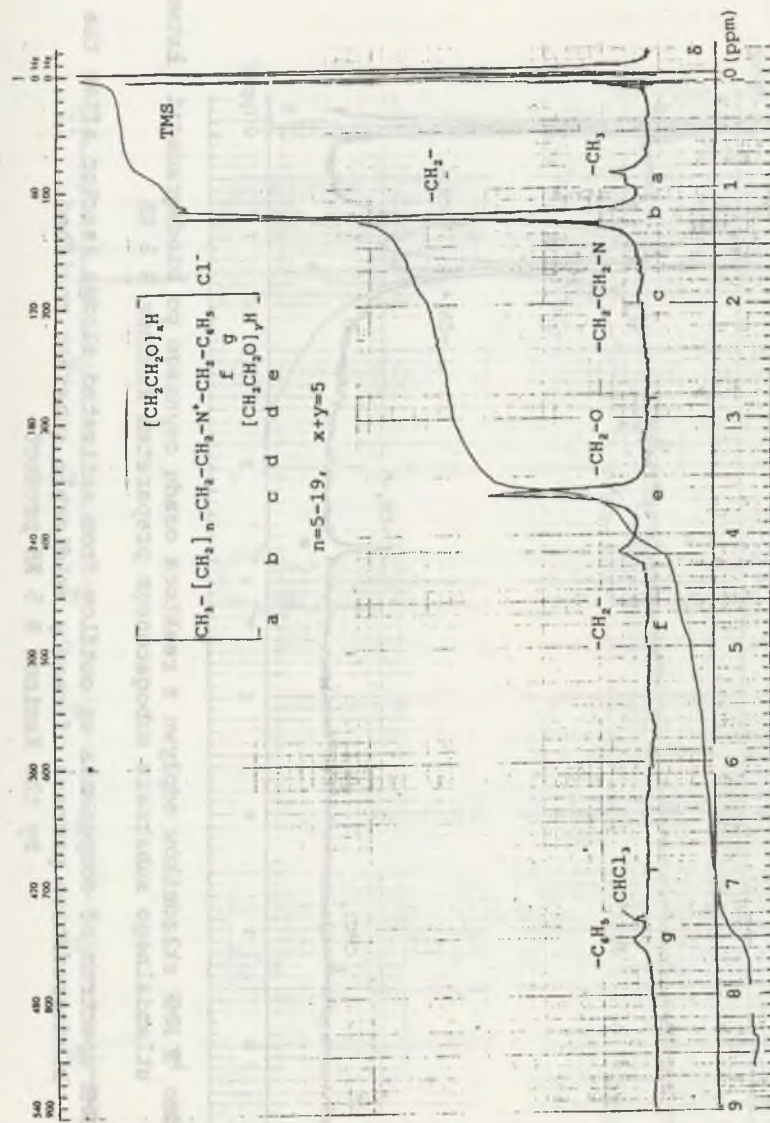
TRANSMISJA 82.5%, 80.9% I 79.9% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA  
 \* JAK W TABELI 29





Rys.18. Zmiany aktywności właściwej dehydrogenaz w procesie biodegradacji metodą osadu czynnego łatwo utlenialego substratu (a) i łatwo utlenialego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 5 RB (b)

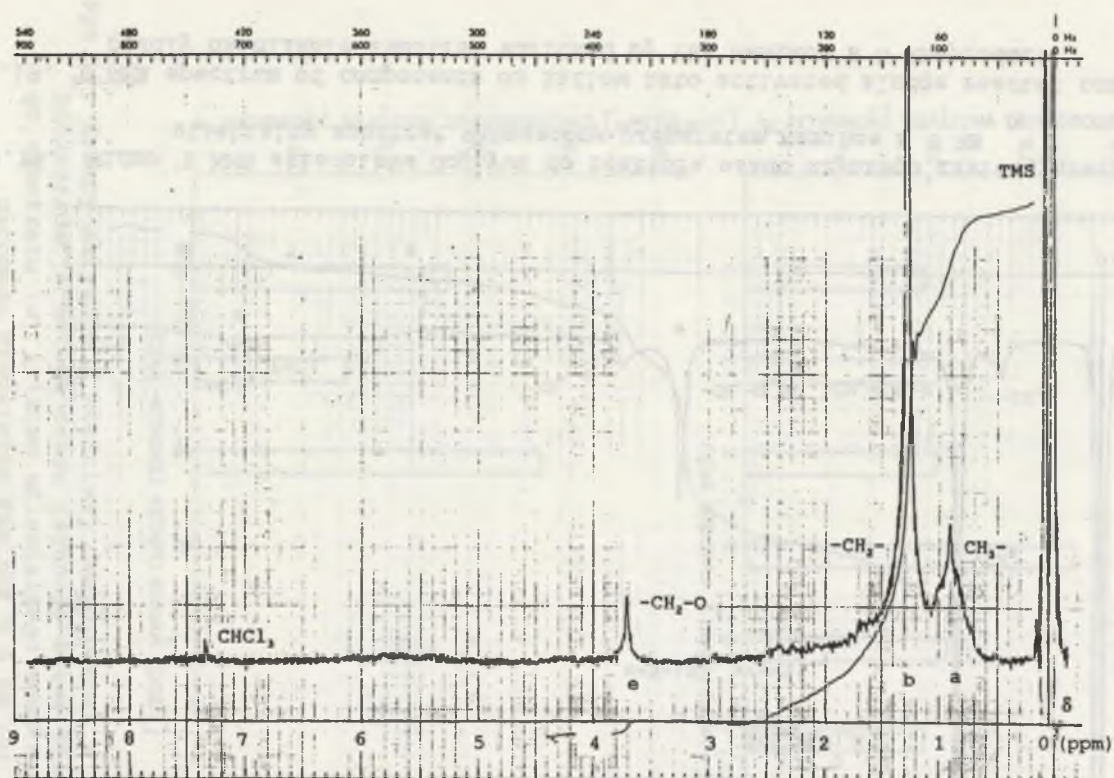
Fig.18. Changes of specific activity dehydrogenases in biodegradation process, activated sludge method, readily oxidizable substrat (a) and readily oxidizable substrat enriched by the Kaminox R 5 RB product (b)



Rys.19. Widmo <sup>1</sup>H NMR składu dopływu do reaktora osadu czynnego zawierającego łatwo utleniaalny substrat wzbogacony preparatem Kaminox R 5 RB

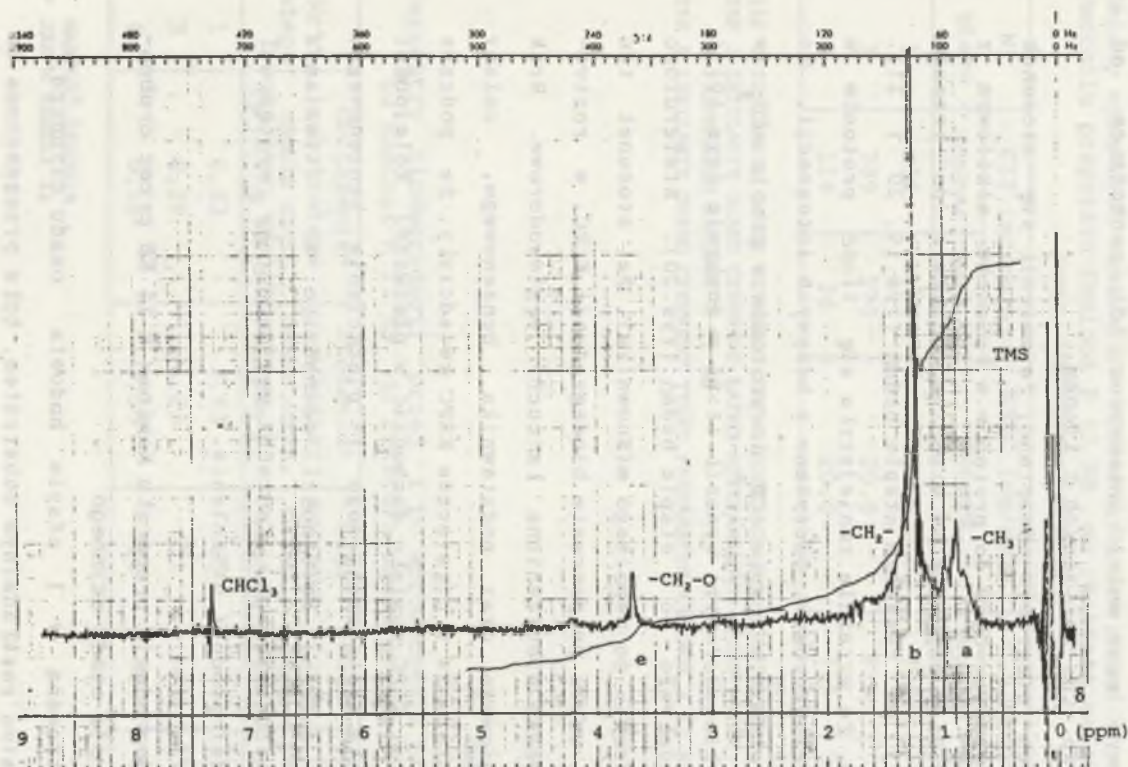
Fig.19. <sup>1</sup>H NMR spectrum of components on inflow into activated sludge reactor containing readily oxidizable substrat enriched by the Kaminox R 5 RB product





Rys.20. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji łatwo utleniającego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 5 RB

Fig.20.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation process of readily oxidizable substrate enriched by the Kaminox R 5 RB product



Rys.21. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji preparatu Kaminox R 5 RB

Fig.21.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation of Kaminox R 5 RB product



cego od protonów związanych z azotem jak również impulsów (f) i (g) powiązanych z protonami pierścienia benzenowego. Natomiast są widoczne sygnały (a) i (b) protonów grup metylowych i metylenowych związanych z łańcuchem węglowodorowym oraz mniej intensywne (d) pochodzące od protonów grup  $-CH_2-$  związanych z tlenem.

Z krzywych integracji odczytano, że zmienił się stosunek protonów w grupie  $-CH_2-O$  do protonów w łańcuchu alkiowym z wartości 58:96 w dopływie na 4:186 w odpływie po trzecim i na 10:113 po czwartym etapie badań (rys.19, 20 i 21). Stwierdzono, że wyraźnie zmniejszyła się ilość protonów w łańcuchu wieloeterowym. Odczytano z krzywych integracji, że stosunek protonów w grupie  $-CH_3$  do protonów w grupie  $-CH_2-$  (w łańcuchu węglowodorowym) wynosił 11:85 w dopływie (rys.19) i 35:151 w odpływie po 3 etapie badań (rys.20). Stwierdzono (po sprowadzeniu do wspólnego mianownika), że stosunek ten był stały, czyli po procesie biodegradacji KCPC, w roztworze były obecne nieutlenione łańcuchy węglowodorowe. Brak azotu amoniowego oraz podstawnika benzenowego, zmiany ilościowe protonów w cząsteczce KSPC świadczyły, że podczas biodegradacji KSPC musiało dochodzić w pierwszej kolejności do utleniania azotu amoniowego i pierścienia benzenowego, dopiero w dalszej kolejności dochodziło do utleniania łańcucha wieloeterowego. Łańcuch węglowodorowy występował jako pośredni produkt utlenienia.

#### 4.2.5. Biodegradacja preparatu Kaminox R 11 RB przez drobno-ustroje osadu czynnego

Zapoczątkowana w 1 etapie hodowla osadu czynnego, zasilana łatwo rozkładalnym substratem, była przeznaczona do badań biochemicznej destrukcji preparatu, którego substancją aktywną była czwartorzędowa sól amoniowa posiadająca łańcuchy węglowodorowe od  $C_{18}H_{37}$  do  $C_{22}H_{45}$  oraz pierścieni

Tabela 31

Zmiany wybranych wskaźników zanieczyszczeń przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 11 RB do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr etapu	CZT [mg/dm <sup>3</sup> ]		KSPC [mg/dm <sup>3</sup> ] dopływ	Odczyn	
	dopływ	odpływ		dopływ	odpływ
1	458	114	-	7.4	8.0
3	789	170	20.0	8.3	8.5
4	114	36	20.0	7.9	7.6

ETAP 1 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM  
 ETAP 3 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO ŁATWO ROZKŁADALNYM SUBSTRATEM I PREPARATEM KAMINOX R 11 RB  
 ETAP 4 ZASILANIE OSADU CZYNNEGO TYLKO PREPARATEM KAMINOX R 11 RB

Tabela 32

Parametry biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 11 RB do reaktora osadu czynnego

Nr** etapu	Obciążenie* substratowe osadu czyn. [g CZT/g sm d]	Stężenie* zawiesiny osadu czyn. [g/dm <sup>3</sup> ]	Czas* napowietrzania [godz]	Wiek* osadu czyn. [d]	Indeks* Mohl-manna [cm <sup>3</sup> /g]
1	0.33	3.63	15	7-17	192-529
3	0.20	4.25	21	6-20	178-366
4	0.10	3.00	15	>20	64-95

\* WARTOŚĆ ŚREDNIA

\*\* JAK W TABELI 31



Tabela 33

Efekty biodegradacji przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 11 RB do reaktora osadu czynnego, wartości średnie

Nr* etapu	Usunięcie [ % ]	
	CZT	KSPC
1	75	-
3	78	90
4	78	100

\* JAK W TABELI 31

Tabela 34

Przemiany związków azotowych w procesie biodegradacyjnym przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 11 RB do reaktora osadu czynnego

Nr* eta- pu	Mineralne formy azotu [ mg N/dm <sup>3</sup> ]					
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ	dopływ	odpływ
1	0.4-13.7	0.5-15.7	śl.	śl.	0.4-0.7	0.2-1.7
3	2.5-11.2	8.7-16.7	śl.	śl.	0.1-0.9	5.4-11.3
4	śl.	śl.	śl.	śl.	0	śl.-1.2

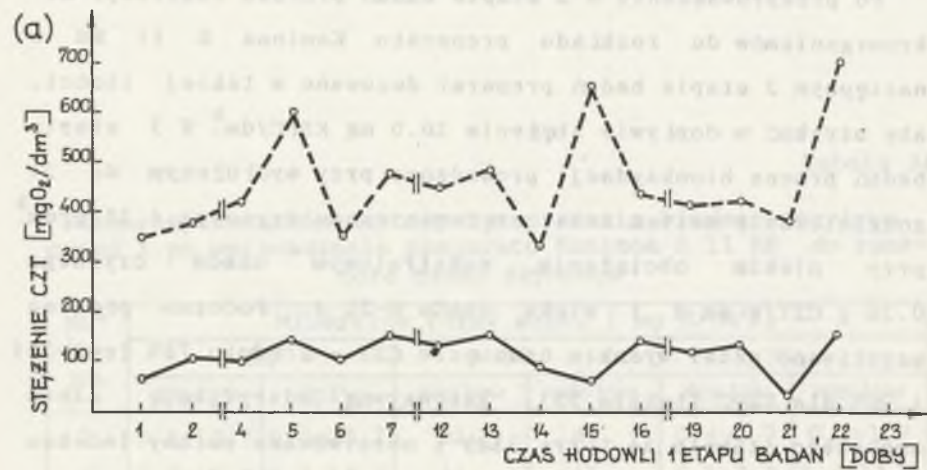
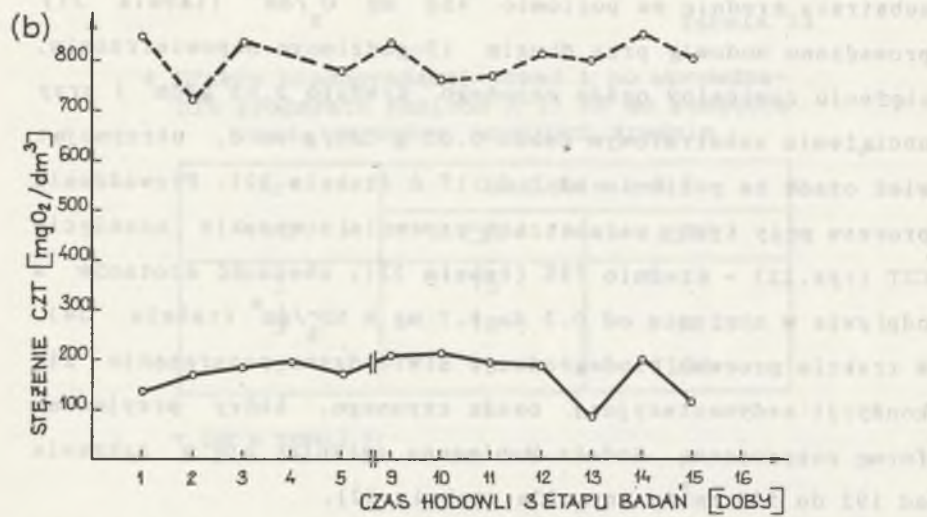
\* JAK W TABELI 31

benzenowy i 11 drobin tlenu etylenu, które były usytuowane w 2 miejscach przy azocie (rys.25). Utrzymując stężenie CZT substratu średnio na poziomie 458 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup> (tabela 31) prowadzono hodowlę przy długim 15-godzinnym napowietrzaniu, stężeniu zawiesiny osadu czynnego średnio 3.63 g/dm<sup>3</sup> i przy obciążeniu substratowym osadu 0.33 g CZT/g sm d, utrzymując wiek osadu na poziomie od 7 do 17 d (tabela 32). Prowadzenie procesu przy tych parametrach zapewniało wysokie usunięcie CZT (rys.22) - średnio 75% (tabela 33), obecność azotanów w odpływie w stężeniu od 0.2 do 1.7 mg N NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/dm<sup>3</sup> (tabela 34). W trakcie procesu biodegradacji stwierdzano pogarszanie się kondycji sedymentacyjnej osadu czynnego, który przyjmował formę rozproszoną. Indeks Mohlmanna zmieniał się w zakresie od 192 do 529 cm<sup>3</sup>/g (rys 23a, tabela 32).

Po przeprowadzeniu w 2 etapie badań procesu adaptacji mikroorganizmów do rozkładu preparatu Kaminox R 11 RB w następnym 3 etapie badań preparat dozowano w takiej ilości, aby uzyskać w dopływie stężenie 20.0 mg KSPC/dm<sup>3</sup>. W 3 etapie badań proces biooksydacji prowadzono przy wydłużonym do 21 godzin czasie natleniania, stężeniu osadu czynnego 4.25 g/dm<sup>3</sup>, przy niskim obciążeniu substratowym osadu czynnego 0.20 g CZT/g sm d i wieku osadu 6-20 d. Podczas procesu uzyskiwano nadal wysokie usunięcie CZT - średnio 78% (rys.22) i 90% dla KSPC (tabela 33), intensywną nitryfikację azotu amonowego (tabela 34 i rys.23d) i obserwowano zmiany indeksu Mohlmanna w zakresie od 178 do 366 cm<sup>3</sup>/g (rys.23b, tabela 32).

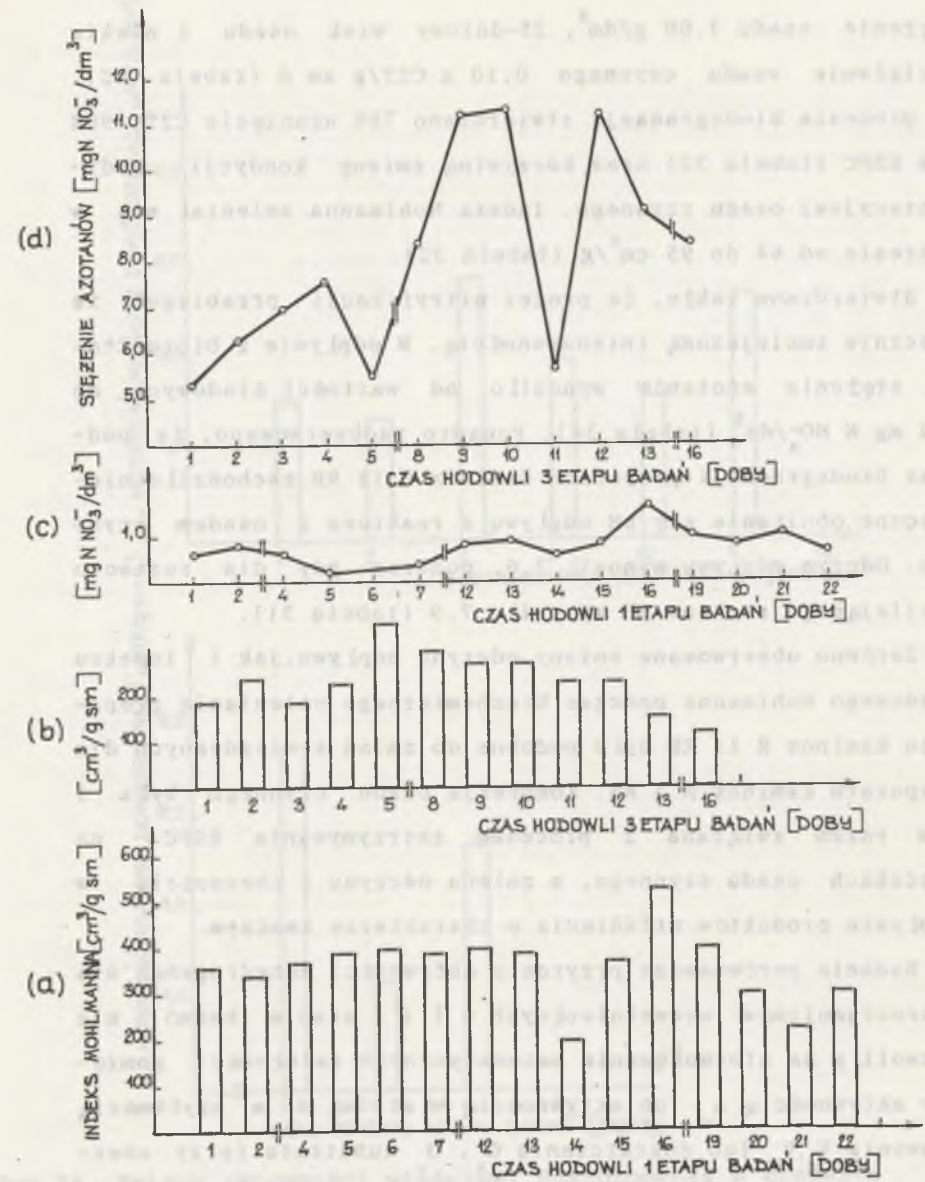
Równie korzystne wyniki biodegradacji KSPC uzyskiwano w 4 etapie prac, kiedy to jako główne źródło węgla i azotu dozowano preparat Kaminox R 11 RB w takiej ilości, aby stężenie kationowej substancji powierzchniowo czynnej wynosiło 20.0 mg KSPC/dm<sup>3</sup>. W 4 etapie prac biodegradację prowadzono przy 15-godzinnym natlenianiu, utrzymując przeciętne





Rys.22. Zmiany stężenia CZT w procesie biodegradacji metodą osadu czynnego łatwo utleniającego substratu (a) i łatwo utleniającego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 11 RB (b)

Fig. 22. Changes of COD concentration in biodegradation process by activated sludge method of readily oxidizable substrat (a) and readily oxidizable substrat enriched by the Kaminox R 11 RB product (b)



Rys.23. Zmiany indeksu Mohlmana i stężenia azotanów przed (a,c) i po (b,d) wprowadzeniu preparatu Kaminox R 11 RB do reaktora osadu czynnego

Fig.23. Changes of Mohlmann's index and nitrate concentration before (a,c) and after (b,d) introducing the Kaminox R 11 RB product into activated sludge reactor

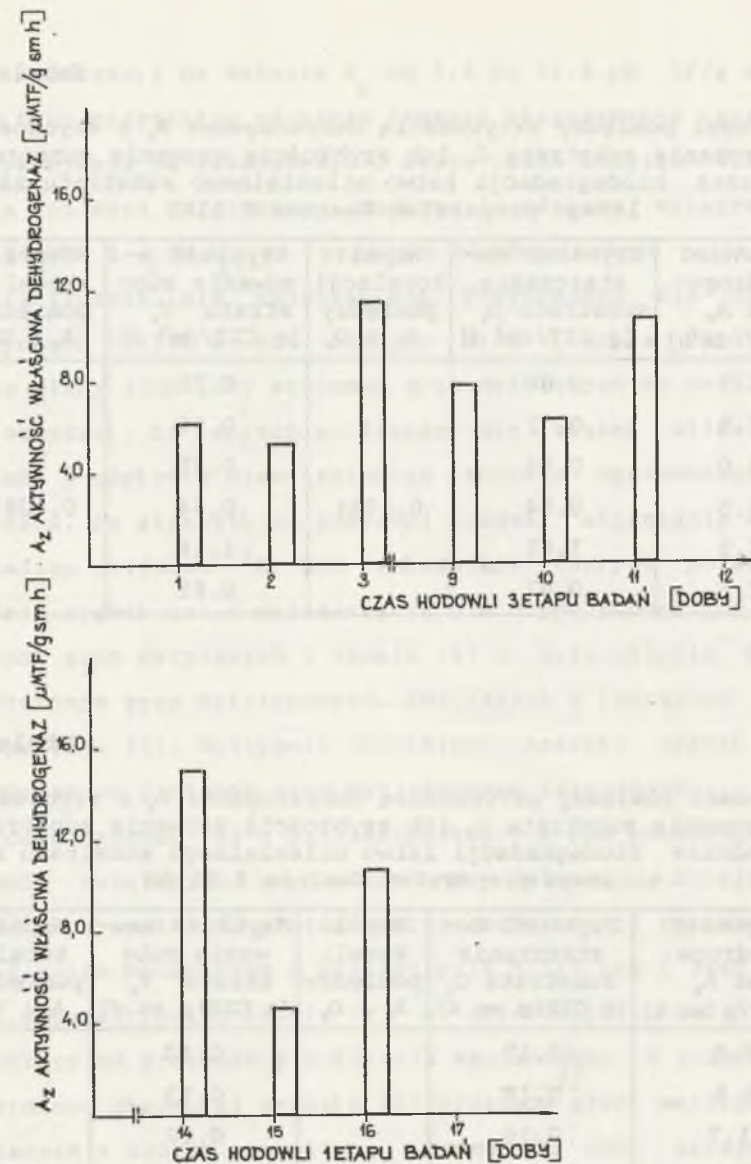


stężenie osadu  $3.00 \text{ g/dm}^3$ , 25-dniowy wiek osadu i niskie obciążenie osadu czynnego  $0.10 \text{ g CZT/g sm d}$  (tabela 32). Po procesie biodegradacji stwierdzano 78% usunięcie CZT, 90% dla KSPC (tabela 33) oraz korzystną zmianę kondycji sedymentacyjnej osadu czynnego. Indeks Mohlmana zmieniał się w zakresie od  $64$  do  $95 \text{ cm}^3/\text{g}$  (tabela 32).

Stwierdzano także, że proces nitryfikacji przebiegał ze znacznie zmniejszoną intensywnością. W odpływie z bioreaktora stężenie azotanów wynosiło od wartości śladowych do  $1.2 \text{ mg N NO}_3^-/\text{dm}^3$  (tabela 34). Ponadto zaobserwowano, że podczas biodegradacji preparatu Kaminox R 11 RB zachodziło nieznaczne obniżanie się pH odpływu z reaktora z osadem czynnym. Odczyn odpływu wynosił  $7.6$ , podczas gdy dla roztworu zasilającego reaktor pH wynosiło  $7.9$  (tabela 31).

Zarówno obserwowane zmiany odczynu odpływu, jak i indeksu osadowego Mohlmana podczas biochemicznego utleniania preparatu Kaminox R 11 RB były podobne do zmian stwierdzanych dla preparatu Kaminox R 5 RB. Kompresja osadu czynnego była i tym razem związana z procesem zatrzymywania KSPC na kłaczkach osadu czynnego, a zmiana odczynu z obecnością w odpływie produktów utlenienia o charakterze kwaśnym.

Badania porównawcze przyrostu aktywności dehydrogenaz dla mikroorganizmów uczestniczących w 1 i 3 etapie badań nie pozwoliły na sformułowanie matematycznych zależności pomiędzy aktywnością  $A_v$  lub aktywnością właściwą  $A_z$  a szybkością usuwania  $V_z, V_v$  lub dostarczania  $O_z, O_v$  substratu (przy obecności KSPC). Korelacja pomiędzy wielkościami była niska, wskazywała na występowanie zależności przypadkowej. Dla  $A_v$  i  $O_v$  wynosiła  $0.3934$  lub  $0.4081$  dla  $A_v$  i  $V_v$  (tabela 35), dla  $A_z$  i  $O_z$  oraz  $A_v$  i  $V_v$  wynosiła odpowiednio  $0.2310$ ,  $0.2430$  (tabela 36) przy założonym poziomie ufności  $p$  95%. Zmiany przyrostu aktywności przedstawione w zależności od czasu ho-



Rys.24. Zmiany aktywności właściwej dehydrogenaz w procesie biodegradacji metodą osadu czynnego łatwo utlenialego substratu (a) i łatwo utlenialego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 11 RB (b)

Fig.24. Changes of specific activity dehydrogenases in biodegradation process, activated sludge method, readily oxidizable substrat (a) and readily oxidizable substrat enriched by the Kaminox R 11 RB product (b)



Tabela 35

Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_v$  a szybkością dostarczania substratu  $O_v$  lub szybkością usuwania substratu  $V_v$  podczas biodegradacji łatwo utleniającego substratu zasilanego preparatem Kaminox R 11RB

Aktywność dehydrogenaz $A_v$ [ $\mu\text{M TF/dm}^3\text{h}$ ]	Szybkość dostarczania substratu $O_v$ [g CZT/dm <sup>3</sup> d]	Współ. korelacji pomiędzy $A_v$ i $O_v$	Szybkość usuwania substratu $V_v$ [g CZT/dm <sup>3</sup> d]	Współ. korel. pomiędzy $A_v$ i $V_v$
27.5	0.80		0.71	
17.5	0.72		0.56	
55.0	0.84		0.65	
42.5	0.84	0.3934	0.64	0.4081
17.5	1.61		1.16	
32.5	0.87		0.65	

Tabela 36

Zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_z$  a szybkością dostarczania substratu  $O_z$  lub szybkością usuwania substratu  $V_z$  podczas biodegradacji łatwo utleniającego substratu zasilanego preparatem Kaminox R 11 RB

Aktywność dehydrogenaz $A_z$ [ $\mu\text{M TF/g sm h}$ ]	Szybkość dostarczania substratu $O_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $O_z$	Szybkość usuwania substratu $V_z$ [g CZT/g sm d]	Współ. korel. pomiędzy $A_z$ i $V_z$
6.0	0.17		0.13	
5.5	0.18		0.13	
11.7	0.16		0.12	
7.6	0.28	0.2310	0.21	0.2430
6.5	0.42		0.30	
10.5	0.24		0.17	

dowoli wskazywały na wahania  $A_z$  od 5.4 do 11.6  $\mu\text{M TF/g sm h}$ , które były niezależne od czasu trwania eksperymentu (rys.24).

Wykonywana na zakończenie 3 etapu badań analiza widmowa IR dla roztworu wzorcowego, dopływu i odpływu wskazywała, że stosunek  $\Delta A_1/\Delta A_2$  po procesie biochemicznego utleniania praktycznie nie zmieniał się. Przykładowo dla dopływu wynosił 1.53, a dla odpływu 1.49 (tabela 38).

Prawie stały ilościowy stosunek grup metylowych do metylenowych oznaczał, że łańcuch alifatyczny nie został utleniony. Obecność w odpływie nieutlenionego łańcucha węglowodorowego oznaczała, że stanowił on pośredni produkt utleniania KSPC.

Analiza widmowa  $^1\text{H NMR}$  składników dopływu pozwoliła wyróżnić sygnał (a) o przesunięciu  $\delta:0.9$  ppm pochodzący od protonów grup metylowych i impuls (b) o przesunięciu  $\delta:1.3$  ppm protonów grup metylenowych, związanych z łańcuchem alkiowym (rys.25). Następnie wyróżniono szeroki sygnał (c) pochodzący od protonów grup metylenowych związanych z azotem, dalej sygnał (e) o przesunięciu  $\delta:3.6$  ppm pochodzący od protonów związanych z tlenem. W dalszej kolejności wyróżniono impuls (f) protonów grupy metylenowej związanej z pierścieniem benzenowym o przesunięciu  $\delta:5.7$  ppm i jako ostatni zarejestrowano impuls (g) o przesunięciu  $\delta:7.5$  ppm pochodzący od protonów pierścienia benzenowego. W widmie nie stwierdzono obecności sygnału (d) protonów grup metylenowych związanych z azotem amoniowym. Widmo  $^1\text{H NMR}$  składników odpływu, zarówno po procesie biodegradacji prowadzonej w obecności łatwo utleniającego substratu, jak i w warunkach, gdy preparat Kaminox R 11 RB stanowił główne źródło węgla i azotu, wskazywało na brak sygnałów pochodzących od protonów (c) skupionych przy azocie (metyloaminie) oraz od protonów (e) grupy metylenowej związanej z pierścieniem benzenowym, jak i od protonów (f) pierścienia benzenowego. Natomiast sygnał (d) pochodzący od protonów związanych z tlenem tylko słabo



Tabela 37

Intensywność pasm  $-\text{CH}_3$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 11 RB do reaktora osadu czynnego

Nr próby	Transmisja $T_1 -\text{CH}_3$ (2970) $\text{cm}^{-1}$	Absorbancja $A_1 -\text{CH}_3$ (2970) $\text{cm}^{-1}$	$\Delta A_1$ [jedn.abs.]
	[%]	[jedn.abs.]	
1	48.5	0.3143	0.2255
	81.5	0.0888	
2	17.0	0.7696	0.6561
	77.0	0.1135	
3	34.5	0.4622	0.3755
	81.9	0.0867	

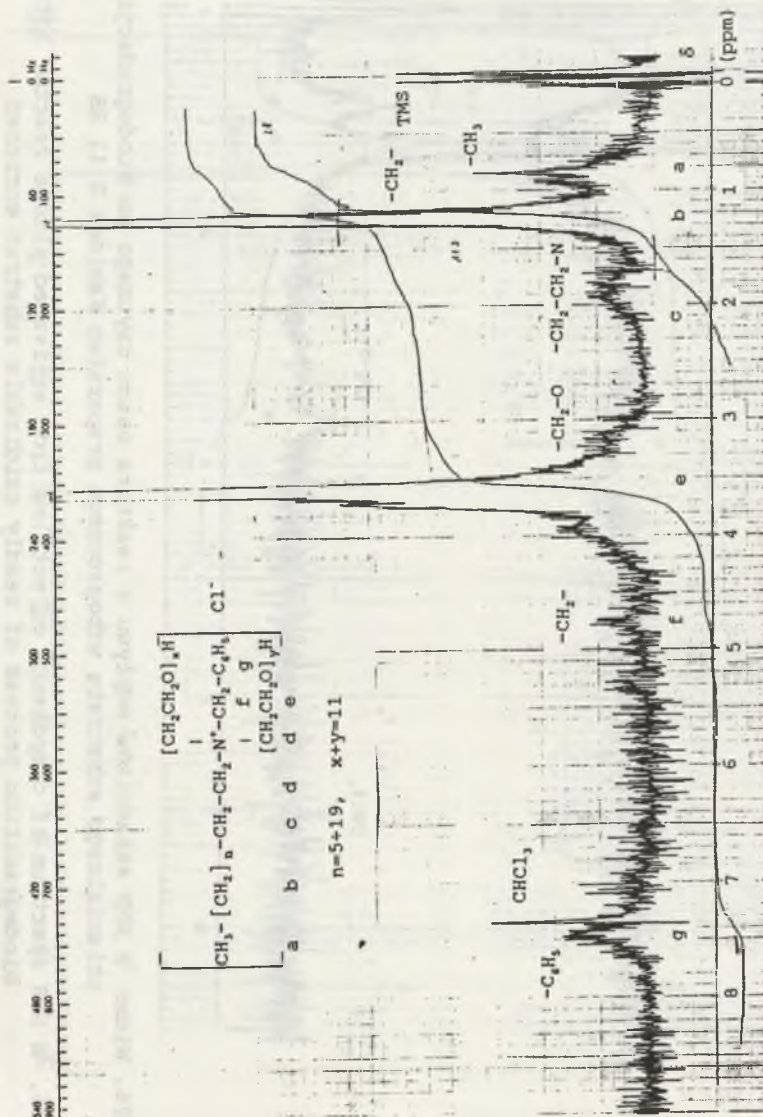
TRANSMISJA 81.5%, 77.0% i 81.9% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA  
 PRÓBA 1 ROZTWÓR WZORCOWY  
 PRÓBA 2 PRZED PROCESEM BIODEGRADACJI  
 PRÓBA 3 PO PROCESIE BIODEGRADACJI

Tabela 38

Intensywność pasm  $-\text{CH}_2-$  wzorca oraz prób przed i po wprowadzeniu preparatu Kaminox R 11 RB do reaktora osadu czynnego

Nr* próby	Transmisja $T_2 -\text{CH}_2-$ (2930) $\text{cm}^{-1}$	Absorbancja $A_2 -\text{CH}_2-$ (2930) $\text{cm}^{-1}$	$\Delta A_2$ [jedn.abs.]	$\frac{\Delta A_1}{\Delta A_2}$
	[%]	[jedn.abs.]		
1	60.8	0.2161	0.1273	1.77
	81.5	0.0888		
2	29.0	0.5373	0.4269	1.53
	77.5	0.1107		
3	45.9	0.3382	0.2515	1.49
	81.9	0.0867		

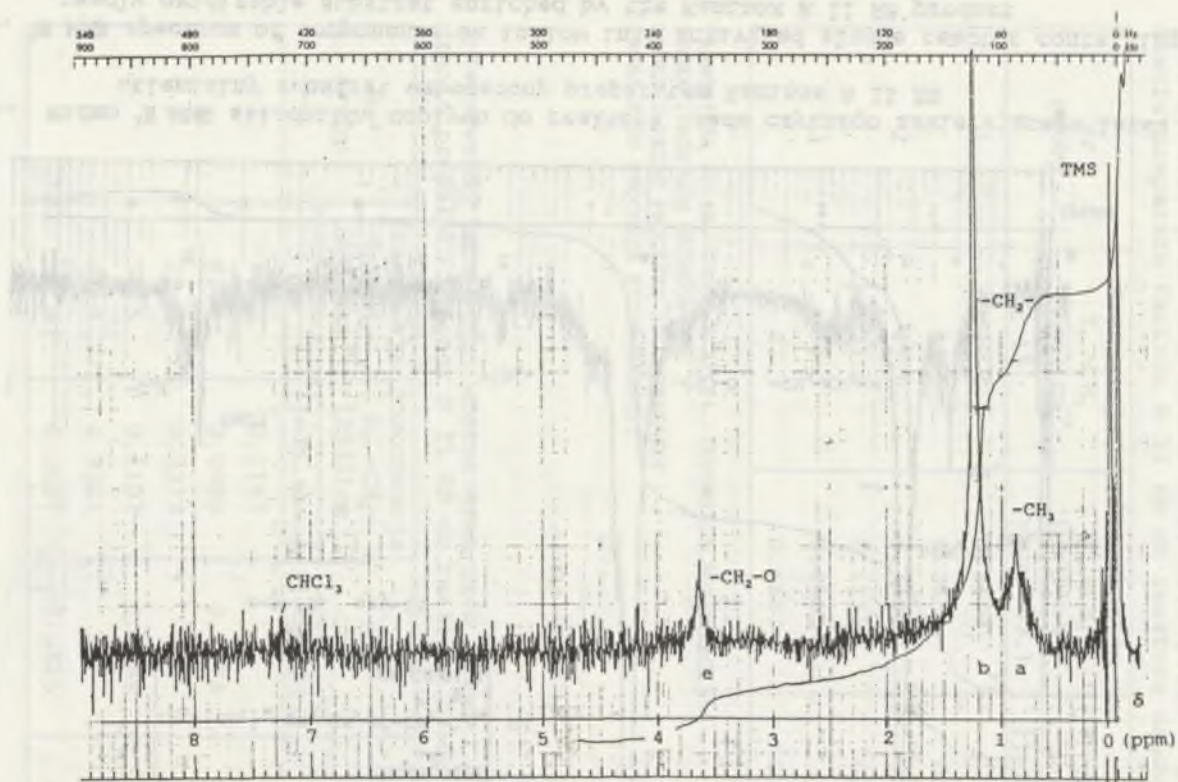
TRANSMISJA 81.5%, 77.5% i 81.9% ODPOWIADA POZIOMOWI TŁA  
 \* JAK W TABELI 37



Rys.25. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników dopływu do reaktora osadu czynnego zawierającego łatwo utleniały substrat wzbogacony preparatem Kaminox R 11 RB

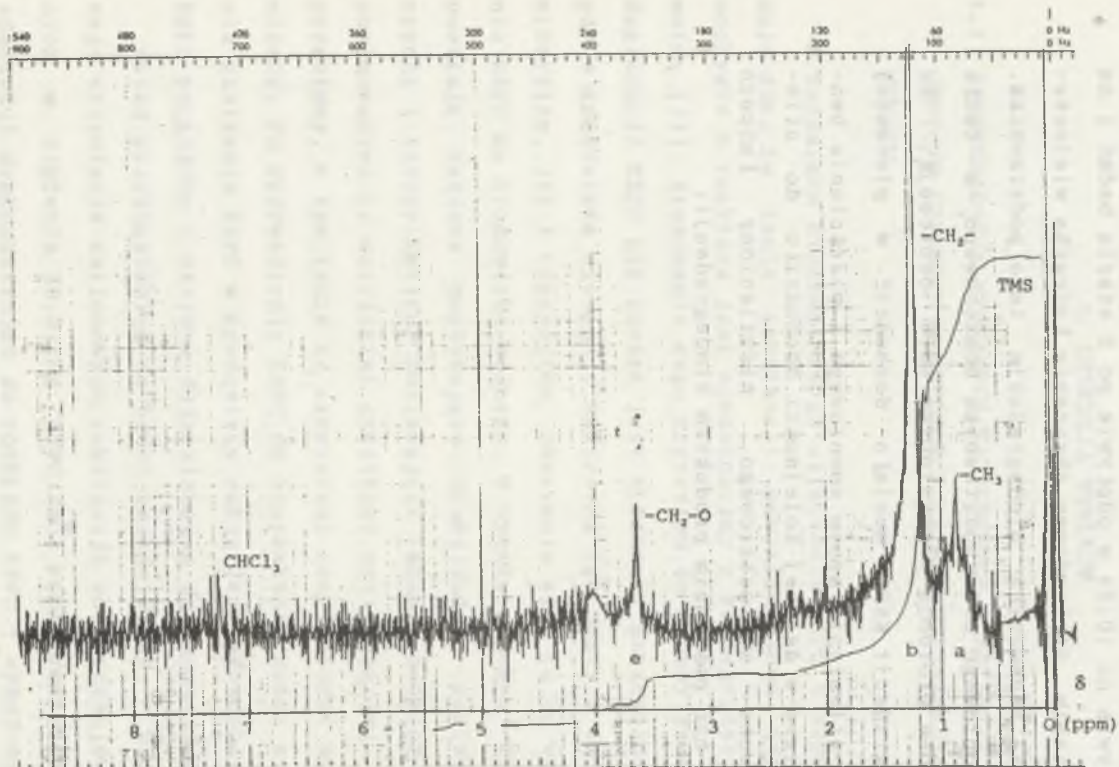
Fig.25.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on inflow into activated sludge reactor containing readily oxidizable substrate enriched by the Kaminox R 11 RB product





Rys.26. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji łatwo utleniaelnego substratu wzbogaconego preparatem Kaminox R 11 RB

Fig.26.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation process of readily oxidizable substrat enriched by the Kaminox R 11 RB product



Rys.27. Widmo  $^1\text{H}$  NMR składników odpływu z reaktora osadu czynnego po biodegradacji preparatu Kaminox R 11 RB

Fig.27.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of components on outflow from activated sludge reactor after the biodegradation of Kaminox R 11 RB product



zaznaczył swoją obecność (rys.26 i 27). Z krzywych integracji odczytano, że zmienił się stosunek protonów łańcucha wieloeterowego do protonów łańcucha alkilowego z wartości 100:65 w dopływie na 10:84 w odpływie po 3 etapie badań i na 10:100 po 4 etapie. Stwierdzono skracanie łańcucha wieloeterowego, czyli zachodziła biodegradacja tego podstawnika. Brak azotu amoniowego oraz podstawnika benzenowego, a także zmiany ilościowe protonów w cząsteczce KSPC oznaczają, że podczas biodegradacji KSPC musiało dochodzić w pierwszej kolejności do utleniania azotu amoniowego i pierścienia benzenowego, dopiero w dalszej kolejności dochodziło do utleniania łańcucha wieloeterowego, nieutleniony łańcuch węglowodorowy był pośrednim produktem biodegradacji.

## 5. Dyskusja Wyników

### 5.1. BIODEGRADACJA WYBRANYCH KATIONOWYCH SUBSTANCJI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH W OBECNOŚCI ŁATWO UTLENIALNEGO SUBSTRATU

W badaniach biochemicznego utleniania ASPC i NSPC przyjmuje się, że zanik substancji powierzchniowo czynnych w odpływie z reaktora jest równoznaczny z biodegradacją pierwotną [51]. Stosowanie tego kryterium do oceny procesu biodegradacji KSPC nie zawsze jest słuszne, szczególnie wtedy gdy w środowisku występuje zawiesina lub osady i to zarówno mineralne, jak i organiczne. Obserwuje się, że po wprowadzeniu KSPC do środowiska wodnego, w wyniku procesu dysocjacji powstają kationy posiadające właściwości powierzchniowo czynne i aniony. Kationy posiadające ładunek dodatni wykazują powinowactwo ze wszystkimi cząstkami posiadającymi ładunek przeciwny, w tym także ze skupiskami zooglealnymi mikroorganizmów. Po wprowadzeniu KSPC do bioreaktora prócz stwierdzenia zanikania KSPC w środowisku ważne jest udowodnienie, że było połączone z aktywną działalnością drobnoustrojów.

Przed przystąpieniem do badań zasadniczych, biochemicznego utleniania kationowych substancji powierzchniowo czynnych w stężeniu  $20.0 \text{ mg KSPC/dm}^3$  przeprowadzono proces adaptacji drobnoustrojów do rozkładu KSPC i wyhodowano populacje drobnoustrojów odpornych na toksyczne działanie KSPC oraz uzyskano mikroorganizmy zdolne do wykorzystywania ka-



tionowych substancji powierzchniowo czynnych jako drugorzęd-  
nego źródła węgla.

Dłuższe prowadzenie hodowli mikroorganizmów osadu czynnego przy tej samej dawce KSPC pozwoliło na zebranie większej ilości wyników i określenie możliwości biodegradacji KSPC w obecności łatwo utleniającego substratu, obserwowanie nitryfikacji azotu amonowego, zmian w aktywności dehydrogenazowej mikroorganizmów czy sedymentacji osadu czynnego.

I tak wprowadzenie do bioreaktorów kationowo czynnych substancji powodowało zatrzymywanie i gromadzenie KSPC na kłaczkach osadu czynnego. Dlatego też w odpływie z bioreaktorów nie stwierdzano (lub tylko w niewielkich ilościach) obecności KSPC. Średnie usunięcie KSPC wynosiło od 90 do 100% (tabele 3, 9, 17, 25 i 33). W wyniku gromadzenia się KSPC na kłaczkach osadu czynnego dochodziło do zmiany właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego (rys.5a i 5b, 11a i 11b, 17a i 17b, 23a i 23b). Stwierdzano, że wahania indeksu Mohlmanna były mniejsze podczas dozowania KSPC (rys.5a i 5b, 11a i 11b, 17a i 17b, 23a i 23b). Przykładowo podczas zasilania reaktora łatwo rozkładalnym substratem wzbogaconym w preparat Kamin R MR, indeks Mohlmanna zmieniał się od 165 do 190  $\text{cm}^3/\text{g}$  i tylko jeden raz osiągnął wartość 258  $\text{cm}^3/\text{g}$ , natomiast podczas dozowania łatwo rozkładalnego substratu (1 etap badań) przyjmował wartości 334-715  $\text{cm}^3/\text{g}$  (rys.5a i 5b). Korzystniejsze właściwości sedymentacyjne osadu wpływały na poprawę sprawności oddzielania biomasy i obniżanie wartości CZT odpływu (rys.4b, 10b, 16b, 22b). Stwierdzono, że wystąpiła zmiana struktury osadu z rozproszonego w skupienia stosunkowo dobrze sedymentujące. Zapewniało to zatrzymywanie w skupiskach również drobno-ustrojów czynnych w procesie nitryfikacji i wzrost intensywności tego procesu (rys.5c i 5d, 11c i 11d, 17c i 17d, 23c i 23d). Opisane zmiany były różne od spodziewanych,

zważywszy nie tylko na toksyczne działanie KSPC, ale także ich właściwości powierzchniowo czynne, które zazwyczaj przyczyniają się do wynoszenia osadu czynnego z bioreaktora [76]. Badane KSPC, charakteryzujące się stosunkowo dużym ciężarem cząsteczkowym, wykazywały działanie podobne do obciążników osadu. Wyliczono, że tylko w 3 etapie badań wprowadzono do każdego z bioreaktorów osadu czynnego około 1500 mg KSPC (podczas dozowania ich przez 3 tygodnie, w stężeniu 20.0 mg KSPC/ $\text{dm}^3$ ), z czego zatrzymano na osadzie czynnym 90 do 100%. Pomimo dostarczenia tak dużej ilości substancji toksycznej dla mikroorganizmów (KSPC są stosowane jako środki dezynfekcyjne w szpitalach), nadal obserwowano wysoką sprawność biochemicznego utleniania (rys.4b, 10b, 16b, 22b, tabele 3, 9, 17, 25, 33). Podczas 19- do 21-godzinnego natleniania osadu czynnego wraz z substratem wzbogaconym w KSPC, prowadzenia procesu przy niskim obciążeniu substratowym osadu od 0.14 do 0.20 g CZT/g sm d, usuwano CZT w 73 do 82% (tabele 3, 9, 17, 25, 33).

Proces zatrzymywania i gromadzenia KSPC na osadzie czynnym był badany między innymi przez Pittera [48], Hellmanna [19] i Grabińską-Sotę [15]. Zwrócili oni uwagę, że proces ten wiązał się z podatnością KSPC na biochemiczny rozkład. W tych przypadkach, gdy substancje powierzchniowo czynne nie ulegały biodegradacji, znajdowano w skupiskach mikroorganizmów większe ilości KSPC niż wówczas, gdy ulegały utlenieniu. Ale nawet gdy uznawano kationową substancję powierzchniowo czynną za ulegającą biochemicznej destrukcji, stwierdzano, że około 7% wprowadzonej ilości KSPC pozostawało w skupieniach osadu w stanie nierozłożonym [19]. Uważa się, że w omawianych badaniach tylko część KSPC pozostawała w osadzie czynnym w stanie nieutlenionym przyczyniając się do zmian sedymentacyjnych kłaczek.



Obserwowany brak działania toksycznego KSPC na drobno-ustroje skupione w osadzie czynnym (wysoki stopień usunięcia CZT, intensywny przebieg nitryfikacji) wskazywał, że w procesie biochemicznej degradacji KSPC w obecności łatwo utleniającego substratu dochodziło do utraty właściwości powierzchniowo czynnych i toksycznych KSPC. Na możliwości biodegradacji pierwotnej kationowych substancji powierzchniowo czynnych, przy współdziałaniu mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego albo zespołu mikroorganizmów rzecznych, zwracało uwagę kilku autorów, między innymi Zdybiewska i współautorki [78], Janosz-Rajczyk [27], Grabińska-Sota [15], a ostatnio Clancy i Tanner [10].

Potwierdzeniem możliwości biodegradacyjnych KSPC była między innymi także obserwowana wysoka aktywność dehydrogenaz  $A_z$  (rys. 6b, 12b, 18b, i 24b). Jednakże rozpatrywane zmiany przyrostu aktywności dehydrogenaz  $A_v$  lub  $A_z$  w powiązaniu z szybkością dostarczania substratu  $O_v$  lub  $O_z$ , a także w zależności od szybkości usuwania substratu  $V_z$  wykazały, że przy opisie tych procesów za pomocą formuły matematycznej nie można było stosować liniowego równania (1 stopnia). Badania wykazały, że we wszystkich przypadkach, przy założonym poziomie ufności p 95%, uzyskiwano niski stopień korelacji r pomiędzy aktywnością dehydrogenaz  $A_v$  a szybkością dostarczania  $O_v$  lub  $O_z$  czy też aktywnością  $A_z$  a szybkością usuwania substratu  $V_v$  lub  $V_z$ . Wynosił on od 0.0255 do 0.6052 (tabele 11, 12, 19, 20, 27, 28, 35, 36). Wielu badaczy obserwowało i opisywało równaniami matematycznymi (1 do 4) zależności pomiędzy aktywnością dehydrogenaz a szybkością dostarczania lub usuwania substratu. Między innymi podczas biodegradacji łatwo utleniającego substratu, jak ścieki bytowo-gospodarcze albo podczas biochemicznego ulewniania ścieków przemysłowych obciążonych bezwodnikiem kwasu maleinowego, ftalowego lub fenolem [43, 54]. W przedstawi-

nych badaniach zależności te były zaciemniane przez proces biodegradacji kationowych substancji powierzchniowo czynnych, zachodzący w skupieniach bakteryjnych. Uważa się, że tylko część zatrzymanych KSPC ulegała utlenianiu, powodując przyrost aktywności dehydrogenaz  $A_z$  (rys. 6b, 12b, 18b, 24b). Pozostała część, która znajdowała się w kłaczkach osadu, nie ulegała biodegradacji (o obecności KSPC w kłaczkach osadu czynnego świadczyła zmiana właściwości sedymentacyjnych), znikając ze środowiska (odpływu) nie powodując proporcjonalnego do usuniętego CZT przyrostu aktywności dehydrogenaz. Dlatego nie można było powiązać szybkości dostarczania lub usuwania substratu ze zmianami aktywności  $A_v$ , lub  $A_z$ .

Następnie w celu przeprowadzenia oceny wpływu KSPC na biodegradację łatwo utleniającego substratu wyliczono korzystając z I równania Eckenfeldera stałe szybkości k. Eckenfelder zaleca w interpretacji kinetyki procesu osadu czynnego (dla początkowych stężeń dopływu nie przekraczających BZT<sub>5</sub> 500 mg O<sub>2</sub>/dm<sup>3</sup>) równanie:

$$C_0 - C_e / sm t = k C_e$$

Dla 3 etapu badań wartości k przedstawiały się następująco: 1.580 10<sup>-3</sup> [m<sup>3</sup>/g d] dla bioreaktora zasilanego ściekami bytowo-gospodarczymi i bromkiem cetylotrójmetryloamoniowym, 0.5988 10<sup>-3</sup> [m<sup>3</sup>/g d] dla bioreaktora zasilanego ściekami bytowo-gospodarczymi i preparatem Kamin R MR, 0.7504 10<sup>-3</sup> [m<sup>3</sup>/g d] dla bioreaktora zasilanego ściekami bytowo-gospodarczymi i preparatem Kaminox R 15 MR, 1.0230 10<sup>-3</sup> [m<sup>3</sup>/g d] dla bioreaktora zasilanego ściekami bytowo-gospodarczymi i preparatem Kaminox R 5 RB i 0.9791 10<sup>-3</sup> [m<sup>3</sup>/g d] dla bioreaktora zasilanego ściekami bytowo-gospodarczymi i preparatem Kaminox R 11 RB. Stwierdzono, że były to we wszystkich przypadkach wartości niższe od wyznaczonych w przypadku zasilania bioreaktorów tylko ściekami bytowo-gospodarczymi. Współczynnik k wynosił odpowiednio 1.827 10<sup>-3</sup>, 1.890 10<sup>-3</sup>, 2.886 10<sup>-3</sup>, 2.585 10<sup>-3</sup>.



$1.330 \cdot 10^{-3}$  [ $m^3/g \cdot d$ ]. Oznacza to, że KSPC wprowadzone do ścieków bytowo-gospodarczych spowalniały proces biodegradacji łatwo utleniającego substratu.

## 5.2. UTLENIANIE CZWARTORZĘDOWEGO AZOTU PRZEZ DROBNOUSTROJE OSADU CZYNNEGO

Sprawność procesu biodegradacji (tabele 3, 9, 17, 25, 33) i utrzymująca się aktywność dehydrogenaz (rys. 6b, 12b, 18b, i 24b) podczas wspólnej biodegradacji KSPC i łatwo utleniającego substratu wskazują, że zanikanie tych substancji w środowisku było związane z rozkładem kationu i utratą przez cząsteczkę właściwości powierzchniowo czynnych. Nasunęło to pytanie, czy azot czwartorzędowy znajdujący się w cząsteczce KSPC może być utleniany przez mieszaną populację drobnoustrojów osadu czynnego.

W celu wyjaśnienia tego zagadnienia starano się podtrzymywać hodowle mikroorganizmów osadu czynnego zasilając je preparatami tak, aby stanowiły główne źródło węgla i azotu (4 etap badań) i utrzymywać przy tym stosunkowo długi wiek osadu czynnego [23]. Preparaty dozowano w takim stężeniu, aby uzyskać stężenie  $20.0 \text{ mg KSPC/dm}^3$ . Obciążenie substratowego osadu czynnego inkubowanego przy takich parametrach dopływu wynosiło  $0.04$  do  $0.15 \text{ g CZT/g sm d}$  (tabele 2, 8, 16, 24 i 32). Wiek osadu czynnego utrzymywano na poziomie wyższym od 6 dni (tabele 2, 8, 16, 24 i 32). Prowadzenie hodowli przy niskim obciążeniu substratowym osadu i 13- do 21-godzinnym natlenianiu powodowało od 60 do 82% usunięcie CZT i od 78 do 94% redukcję KSPC (tabele 3, 9, 17, 25 i 33). Stwierdzano, że nadal zachodziła nitryfikacja azotu amonowego. Stężenie azotu azotanowego w poszczególnych odpływach wahało się od wartości śladowych do  $13.2 \text{ mg N NO}_3^-/\text{dm}^3$  (tabele 4, 10, 18, 26 i 34).

Uważa się, że podczas biodegradacji, prowadzonej przy stosunkowo długim czasie napowietrzania obecność azotanów w odpływie ze wszystkich pięciu hodowli było związana z nitryfikacją azotu amonowego zarówno nie pochodzącego, jak i pochodzącego z rozkładu KSPC. Źródłem azotu amonowego nie związanego z rozkładem KSPC były połączenia azotu organicznego uwalniane podczas lizy komórek mikroorganizmów osadu czynnego. Proces rozkładu komórek zachodził w trakcie tlenowej stabilizacji osadu, która miała miejsce podczas prowadzenia hodowli. Dlatego też rozwiązanie zagadnienia utleniania azotu próbowano znaleźć rozpatrując zmiany struktury cząsteczek KSPC przed i po procesie biodegradacji opierając się na analizie spektralnej  $^1\text{H NMR}$ .

Analiza spektralna  $^1\text{H NMR}$  wykonywana dla czterech odpływów wskazuje, że w trzech z nich (Kaminox R 15 RM, Kaminox R 5 RB, Kaminox R 11 RB rys. 15, 21 i 27) nie znajdowano protonów związanych z azotem amoniowym i w czterech (Kamin R RM, Kaminox R 15 RM, Kaminox R 5 RB, Kaminox R 11 RB rys. 9, 15, 21 i 27) nie znajdowano protonów występujących w metyloaminie. Były natomiast obecne sygnały protonów związanych z rodnikami metylowymi i metylenowymi należącymi do łańcuchów węglowodorowych lub sygnały protonów grupy  $-\text{CH}_2-$  łańcuchów wieloeterowych (rys. 9, 15, 21 i 27). Dane te wskazują na całkowite utlenianie (w przypadku preparatów Kaminox R 15 RM, Kaminox R 5 RB, Kaminox R 11 RB rys. 15, 21 i 27) azotu wbudowanego w cząsteczkę KSPC. Natomiast w przypadku preparatu Kamin R MR na występowanie pośrednich produktów utlenienia, w których nadal występował azot czwartorzędowy. Na możliwości utleniania azotu czwartorzędowego przez mikroorganizmy wskazywali zarówno Sullivan [58], jak i Hellmann [19]. O ile Sullivan tylko wnioskował o możliwości utleniania azotu amonowego przez drobnoustroje na podstawie dowodów pośrednich (zajmował się głównie losem węgla wbudowanego



w cząsteczkę KSPC), to Hellmann przedstawił dowód bezpośredni. Autor ten obserwował, po zaszczepleniu próby zawierającej KSPC mieszaną populacją drobnoustrojów pobraną z wód Renu, stopniowy rozkład cząsteczki chlorku dwustearylodwumetyloamoniowego i pojawianie się azotanów. Hellmann przypuszczał, że wykrywane azotany mogły pochodzić z rozkładu amin alifatycznych, przypuszczalnych pośrednich produktów utleniania KSPC. Również Fenger i współautorzy badając rozkład chlorku tetradecylodwumetylobenzylowego przy współdziałaniu mieszanej populacji mikroorganizmów osadu czynnego wykazali, że jako pośredni produkt utlenienia mogła powstawać tetradecylodwumetyloamina [13]. Oznaczało to, że sugestie Pittera [48], Iliča [23] i innych [59] o trwałości KSPC zawierających w cząsteczce azot nie zawsze muszą się sprawdzać. Uważa się, że utlenianie azotu warunkowała budowa cząsteczki KSPC i jego pozycja w drobinie.

### 5.3. WPŁYW STRUKTURY WYBRANYCH KATIONOWYCH SUBSTANCJI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH NA BIODEGRADACJĘ

Na podstawie nielicznych prac dotyczących wpływu struktury chemicznej na biodegradację KSPC można sądzić, że proces biochemicznego rozkładu związany jest między innymi z wielkością masy cząsteczkowej, charakterem wiązania pomiędzy hydrofilową a hydrofobową częścią molekuly, długością i parzystą liczbą węgla łańcucha hydrofobowego, rozgałęzioną strukturą części hydrofobowej molekuly (wiąże się to z surowcami używanymi podczas syntezy) oraz złożonością budowy części hydrofilowej [10, 19, 57, 59, 64].

Przeprowadzona w warunkach laboratoryjnych synteza czterech badanych KSPC była oparta na reakcji amin lub oksyetylowanych amin z chlorkiem metylu lub oksyetylowanych amin z chlorkiem benzylu. Synteza amin była prowadzona z udziałem

porafinacyjnych kwasów tłuszczowych pochodzenia roślinnego. W badanych KSPC występowały łańcuchy alkilowe zawierające parzystą liczbę węgla, głównie 18-22. Były obecne również łańcuchy posiadające 8, 10, 12, 14 i 16 węgla (15%). Łańcuch hydrofobowy poprzez grupę metylenową był połączony z azotem czwartorzędowym. Poszczególne KSPC różniły się między sobą podstawnikami przy azocie [37].

W pierwszym przypadku KSPC (preparat Kamin R RM) posiadała trzy rodniki metylowe przy azocie (rys.7). W drugim (preparat Kaminox R 15 RM) jeden rodnik metylowy i 15 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu, które podstawiono do azotu w dwóch miejscach (rys.13). Następną KSPC (preparat Kaminox R 5 RB) posiadała grupę benzyłową i 5 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu przyłączonych też w dwóch miejscach do azotu (rys.19). Kolejną KSPC (preparat Kaminox R 11 RB) posiadała grupę benzyłową i 11 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu przyłączonych w dwóch miejscach do azotu (rys.25).

Prowadzono również badania dla indywidualnego chemicznego bromku cetylotrójmetyloamoniowego posiadającego 16 węgla w łańcuchu hydrofobowym (rys.1). Preparat ten różnił się od KSPC znajdującej się w preparacie Kamin R MR ilością węgla w łańcuchu węglowodorowym.

Dwie KSPC (preparaty Kamin R MR i Kaminox R 15 RM) różniły się między sobą obecnością dodatkowej grupy hydrofilowej, którą stanowił łańcuch wieloeterowy zbudowany z 15 spolimeryzowanych grup tlenku etylenu. Dwie pozostałe KSPC (preparaty Kaminox R 5 RB i Kaminox R 11 RB) posiadające w miejscu grupy metylowej grupę benzyłową różniły się ilością wprowadzonych spolimeryzowanych grup tlenku etylenu. Biochemiczny rozkład łańcuchów alkilowych oceniano opierając się na spektroskopowych pomiarach widm IR, w których określano zmiany ilościowe grup metylowych i metylenowych.



Wykazano, że w dwóch przypadkach (preparaty Kaminox R 5 RB, Kaminox R 11 RB) znajdowano w zatężonym odpływie niezdegradowane łańcuchy alkilowe (tabele 30, 29, 37 i 38). Świadczyła o tym prawie stała wartość ilorazu  $\Delta A_1/\Delta A_2$  przed i po procesie biodegradacji. Stwierdzono, że nieutlenione łańcuchy alkilowe występowały wówczas, gdy azot w KSPC był podstawiony grupą benzylową i 5 lub 11 spolimeryzowanymi grupami tlenu etylenu.

W dalszych badaniach stwierdzono, że w trzech przypadkach (preparaty Kamin R RM, Kaminox R 15 RM i bromek cetylotrójmetyloamoniowy) w zatężonym odpływie znajdowano zdegradowane łańcuchy alkilowe. Świadczyła o tym wyższa po procesie biodegradacji wartość ilorazu  $\Delta A_1/\Delta A_2$  (tabele 5, 6, 13, 14, 21 i 22). Stwierdzono, że utlenianie łańcuchów alkilowych zachodziło dla tych KSPC, w których azot był podstawiony 3 grupami metylowymi lub 15 grupami tlenu etylenu.

Zaobserwowano, że rozkład łańcuchów węglowodorowych zachodził w KSPC nie zawierających podstawnika benzyłowego. Swisher [59] powołując się na prace Krzemińskiego i Gawła ocenił czwartorzędową sól amoniową, posiadającą od 14 do 16 węgla w łańcuchu węglowodorowym, azot podstawiony dwoma grupami metylowymi i grupę benzyłową jako ulegającą biodegradacji. Sądził, że biochemiczne utlenianie było związane z utratą właściwości powierzchniowo czynnych przez KSPC i utlenieniem grupy benzyłowej. W pracach tych nie rozpatrywano jednak, w jakim stopniu zachodziło biochemiczne utlenianie łańcucha węglowodorowego. Z przeprowadzonych badań wynika, że w przypadku wprowadzenia do cząsteczki KSPC zarówno grupy benzyłowej, jak i spolimeryzowanych grup tlenu etylenu (5 lub 11) nie zachodził proces biodegradacji łańcuchów węglowodorowych.

Możliwość utleniania łańcucha wieloeterowego i podstawnika benzyłowego oceniano opierając się na spektroskopowych pomiarach widma  $^1\text{H}$  NMR zarówno podczas biodegradacji KSPC w

obecności łatwo utleniaelnego substratu, jak i wtedy gdy preparaty stanowiły główne źródło węgla i azotu.

Stwierdzono, że w trzech przypadkach (podczas biodegradacji preparatów Kaminox R 15 RM, Kaminox R 5 RB i Kaminox R 11 RB) w zatężonym odpływie były obecne zdegradowane łańcuchy polieterowe. Świadczyła o tym zmiana ilości protonów w badanych produktach (rys. 14, 15, 20, 21, 26 i 27). Zaobserwowano, że biodegradacja zachodziła w przypadku tych KSPC, w których występował azot podstawiony 15 spolimeryzowanymi grupami tlenu etylenu lub grupą benzyłową i 5 lub 11 spolimeryzowanymi grupami tlenu etylenu.

Badania wykazały, że wprowadzenie 15 spolimeryzowanych grup tlenu etylenu (Kaminox R 15 RM) w miejsce dwóch grup metylowych (Kamin R MR) nie zmieniło podatności na biochemiczny rozkład tej KSPC. Stwierdzano, że dochodziło do degradacji łańcucha węglowodorowego, jak i degradacji łańcucha wieloeterowego.

Stwierdzono także, że wprowadzone do cząsteczki KSPC posiadającej grupę benzyłową łańcuchy wieloeterowe (preparat Kaminox R 5 RB i Kaminox R 11 RB) ulegały biodegradacji.

Zaobserwowano również, że w tych KSPC, w których występował podstawnik benzyłowy (Kaminox R 5 RB i Kaminox R 11 RB), zawsze zachodziło utlenianie grupy benzyłowej. Sądzono tak, gdyż w zatężonych odpływach nie znajdowano sygnałów protonów związanych z tą grupą (rys. 20, 21, 26 i 27).

Stwierdzony w pracy rozkład grupy benzyłowej był opisywany wcześniej przez różnych autorów [59].

Dotychczas przyjmowano, że ze wzrostem ilości spolimeryzowanych grup tlenu etylenu w łańcuchu wieloeterowym powyżej 20 obniża się podatność SPC na biodegradację [59, 64]. W pracy zaobserwowano, że pogorszenie możliwości degradacyjnych KSPC wystąpiło (łańcuchy węglowodorowe nie ulegały degradacji), gdy w łańcuchu wieloeterowym występowało 5 lub 11



spolimeryzowanych grup tlenku etylenu i równocześnie obecna była grupa benzylowa. Oznaczało to, że związek pomiędzy budową cząsteczki KSPC a podatnością na biodegradację nie przedstawiał się tylko jako prosta zależność pomiędzy ilością grup hydrofilowych lub obecnością podstawnika benzenowego. Był on bardziej skomplikowany i wiązał się też z reaktywnością podstawników przy azocie.

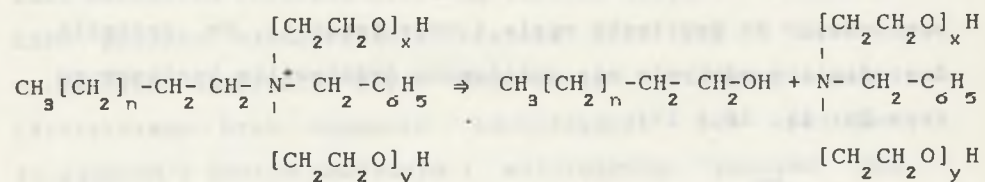
#### 5.4. MECHANIZM BIODEGRADACJI WYBRANYCH KATIONOWYCH SUBSTANCJI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH PRZEZ DROBNOUSTROJE OSADU CZYNNEGO

Wykorzystywanie analizy spektralnej IR i  $^1\text{H}$  NMR podczas prac nad biodegradacją pozwalało na śledzenie losów podstawników, takich jak grupy metylowe, metylenowe, benzylowe, spolimeryzowane grupy tlenku etylenu oraz czwartorzędowego azotu i łańcucha węglowodorowego występujących w cząsteczce KSPC.

Stwierdzono, że mechanizm biodegradacji był związany ze strukturą cząsteczki i populacją mikroorganizmów, która wykształcała się w poszczególnych reaktorach.

Dla tych KSPC, które posiadały w swej strukturze prócz łańcucha hydrofobowego podstawnik benzylowy i spolimeryzowane grupy tlenku etylenu, przyłączone w dwóch miejscach do azotu (preparat Kaminox R 5 RB i Kaminox R 11 RB), biodegradacja rozpoczynała się od rozkładu kationu. Proces ten powodował przede wszystkim utratę właściwości powierzchniowo czynnych i toksycznych KSPC. Sądzone tak na podstawie zaniku KSPC w odplywie (tabele 25 i 33), po przebiegu procesu biodegradacji CZT (rys. 16 i 22) oraz biodegradacji azotu czwartorzędowego (rys. 19, 20, 25 i 26) i utrzymującej się aktywności dehydrogenaz (rys. 18 i 24). Proces rozkładu kationu wiązał się w pierwszej kolejności z wytworzeniem odpowiednich (w zależności od liczby węgla w łańcuchu węglowodoro-

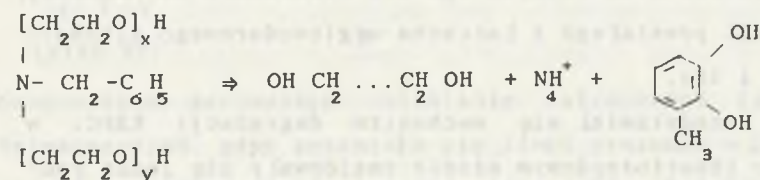
wym) alkoholi oraz aminy aromatycznej (etap 1a), która ulegała dalszemu rozkładowi.



$$n=5-10, \quad x+y=5 \text{ lub } 11$$

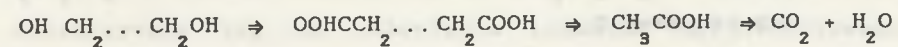
(etap 1a)

W wyniku rozkładu dochodziło do odłączenia podstawnika benzenowego i łańcuchów wieloeterowych (etap 2a).



(etap 2a)

W dalszej kolejności zachodziło utlenianie łańcuchów wieloeterowych też do odpowiednich alkoholi i dalej do kwasów. Powstający kwas karboksylowy był z kolei utleniany do dwutlenku węgla. Odłączanie kwasu karboksylowego powodowało stopniowe skracanie łańcucha wieloeterowego (etap 3a). Na taki przebieg biodegradacji wskazuje zmieniająca się w trakcie tego procesu liczba protonów w łańcuchu wieloeterowym (rys. 20, 21, 22, 25, 26 i 27).



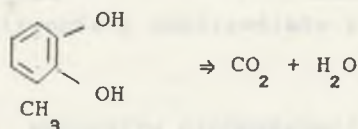
(etap 3a)

Amina aromatyczna po odłączeniu podstawnika benzylowego i łańcucha wieloeterowego ulegała degradacji do jonu amonowego i dalej do azotanów. Uważa się tak, gdyż w żadnym z odplywów



nie stwierdzano obecności aminy aromatycznej (rys.21, 22, 26 i 27), natomiast były obecne azotany (tabele 26 i 34).

Uważa się, że następnie zachodziło utlenianie pierścienia benzenowego do dwutlenku węgla i wody (etap 4). Po procesie degradacji w odplwywie nie znajdowano podstawnika benzenowego (rys.20, 21, 26 i 27).

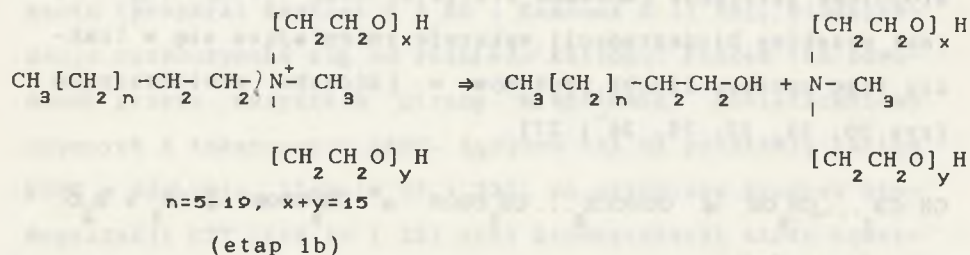


(etap 4a)

W przypadku występowania w cząsteczce 5 lub 11 grup tlenku etylenu i podstawnika benzyloвого nie dochodziło do dalszej biodegradacji powstałego z łańcucha węglowodorowego alkoholu (tabele 30 i 38).

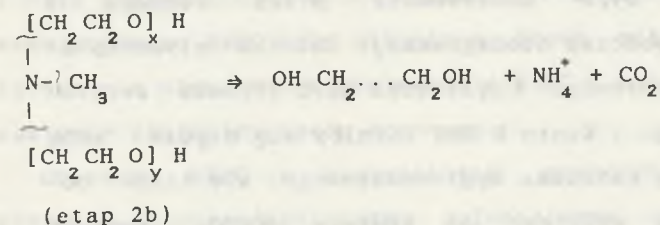
Podobnie przedstawiał się mechanizm degradacji KSPC, w której przy czwartorzędowym azocie znajdowały się jeden rodnik metylowy i łańcuchy epoksydowe (posiadające w sumie 15 spolimeryzowanych drobin tlenku etylenu), podstawione w dwóch miejscach do azotu (Kaminox R 15 RM).

Proces biodegradacji KSPC rozpoczynał się rozkładem kationu i utratą właściwości powierzchniowo czynnych jak i toksycznych (etap 1b).



Proces ten też wiązał się z powstaniem odpowiednich alkoholi i aminy, później następował rozkład aminy, związany z powstaniem odpowiednich (w zależności od liczby węgla w

łańcuchu wieloeterowym) alkoholi i utlenieniem azotu organicznego do azotu amonowego (etap 2b) i dalej do azotanów. Na taki mechanizm rozkładu wskazują zarówno wysokie usunięcie KSPC podczas biodegradacji (tabela 17), jak i brak w zatężonych odplwywach azotu amoniowego lub metyloaminy. (Stwierdzano brak sygnałów pochodzących od protonów związanych z azotem amoniowym i metyloaminą, podczas gdy znajdowano sygnały pochodzące od protonów związanych z grupą metylową, metylenową albo z tlenem rys.15).



Równocześnie zachodziło utlenianie (skracanie) łańcuchów wieloeterowych, gdyż zmieniała się ilość protonów w łańcuchu przed i po biodegradacji (rys.13, 14 i 15). Przebieg tego procesu był zgodny z etapem 3a. Stwierdzono też, że dochodziło do utleniania alkoholi, powstałych z odłączonych łańcuchów węglowodorowych. Wskazuje na to malejąca w trakcie procesu ilość grup metylenowych (obserwowano wzrost ilorazu  $\Delta A_1 / \Delta A_2$  - tabela 22). Był to etap 4b, przebieg biodegradacji był zgodny z mechanizmem  $\beta$ -oksydacji pokazanym na stronie 36. Natomiast w przypadku obecności w cząsteczce łańcucha węglowodorowego przyłączonego do azotu czwartorzędowego, do którego były podstawione trzy grupy metylowe (Kamin R RM i bromek cetylotrójmetyloamoniowy), biodegradacja rozpoczynała się od utlenienia łańcucha węglowodorowego według mechanizmu  $\omega$ -oksydacji podanej na stronie 34 a następnie według  $\beta$ -oksydacji przedstawionej na stronie 36. Wskazuje na to zmniejszająca się ilość grup metylenowych w łańcuchu (tabele 6 i 14) oraz obecność azotu amoniowego



(rys.8 i 9) bądź metyloaminy (rys.2 i 3). Przypuszcza się, że taki mechanizm biodegradacji był związany z obecnością w cząsteczce azotu podstawionego trzema grupami metylowymi. Ugrupowanie to uważane jest za względnie stabilne [49, 50]. Można zaznaczyć, że o ile w procesie biodegradacji bromku cetylotrójmetyloamoniowego stwierdzano pojawianie się metyloaminy, to podczas biochemicznego utleniania preparatu Kamin R RM w odpływie obecny był azot amoniowy (rys.2 i 8). Powstawanie tetradecyloardumetyloaminy jako pośredniego produktu utleniania było obserwowane przez Fengera i współautorów [13] podczas biodegradacji chlorku tetradecyloardumetylobenzyloamoniowego. Cząsteczki KSPC (bromku cetylotrójmetyloamoniowego i Kamin R RM) różniły się między sobą nie tylko długością łańcucha węglowodorowego, ale także pochodzeniem surowca wziętego do syntezy KSPC. Łańcuch węglowodorowy w preparacie Kamin R MR pochodził z porafinacyjnych naturalnych kwasów rzepakowych, natomiast w bromku cetylotrójmetyloamoniowym był sztucznie syntetyzowany.

Hellmann [19] badając biodegradację chlorku dwustearyno-dwumetyloamoniowego przy udziale mieszanej populacji drobnoustrojów rzecznych stwierdził, że w próbie pojawiały się azotany, mimo że były obecne łańcuchy alifatyczne. Nasunęło to przypuszczenie, że proces biodegradacji alkilu może być poprzedzany rozkładem kationu i utlenianiem azotu amoniowego do azotanów. Uważa się, że przedstawione wyniki badań pozwalają sądzić, że biodegradacja trzech testowanych KSPC, w których azot był podstawiony dwoma łańcuchami wieloeterowymi i grupą benzylową bądź grupą metylową, prowadzona za pomocą drobnoustrojów osadu czynnego, również rozpoczynała się od rozkładu kationu. Inny mechanizm degradacyjny rozpoczynający się od utleniania alkilu obserwowano wówczas, gdy w cząsteczce występował azot podstawiony łańcuchem węglowodorowym i trzema grupami metylowymi.

## 6. WNIOSKI

1. Przebadane kationowe substancje powierzchniowo czynne po wprowadzeniu do bioreaktora były zatrzymywane na osadzie czynnym, który zmieniał swoje właściwości sedymentacyjne.
2. Przy stężeniach do  $20.0 \text{ mg/dm}^3$  zatrzymane w kłaczkach osadu czynnego KSPC były utleniane przez mikroorganizmy i dlatego nie obserwowano wypieniania KSPC i wynoszenia z bioreaktorów zawiesiny osadu czynnego.
3. Obecność KSPC w bioreaktorze powodowała obniżenie szybkości biodegradacji łatwo utleniającego substratu oraz zmiany w aktywności dehydrogenaz. KSPC były bardzo wolno utleniane przez mikroorganizmy osadu czynnego i dlatego zmian w aktywności dehydrogenaz nie można było łączyć z szybkością usuwania lub dostarczania substratu.
4. Badane KSPC należy zaliczyć do substancji trudno rozkładalnych, gdyż przy obecności w ściekach surowych w stężeniu  $20.0 \text{ mg/dm}^3$  obniżały szybkość procesu biodegradacji.
5. Stwierdzono, że mechanizm biodegradacji był powiązany z budową cząsteczki KSPC i populacją mikroorganizmów, która wykształciła się w poszczególnych bioreaktorach.
6. Dla tych KSPC, w których występowały grupa benzenowa i 5 lub 11 spolimeryzowanych grup tlenu etylenu, azot amoniowy oraz łańcuch węglowodorowy z 18 do 22 węglami, proces biooksydacji rozpoczynał się rozkładem kationu, po czym zachodziło utlenianie azotu amoniowego, grupy benzylovej i łańcucha wieloeterowego. Nie dochodziło jednakże do oksyda-



łańcucha wieloeterowego. Nie dochodziło jednakże do oksydacji łańcucha węglowodorowego.

7. Biodegradacja KSPC, w której występowały przy azocie amoniowym łańcuch węglowodorowy z 18 do 22 węglami, grupa metylowa i dwa łańcuchy wieloeterowe biooksydacja rozpoczynała się też rozkładem kationu, po czym zachodziło utlenianie azotu amoniowego, łańcucha wieloeterowego i łańcucha węglowodorowego.

6. Proces biodegradacji KSPC, w której przy azocie amoniowym występowały trzy grupy metylowe i łańcuch węglowodorowy z 16 lub 18 do 22 węglami, rozpoczynał się od utleniania łańcucha węglowodorowego. Proces biodegradacji łączył się z powstawaniem metyloaminy lub alkiloaminy w zależności od ilości węgla w łańcuchu węglowodorowym.

7. Stwierdzono, że w tych KSPC, w których w miejsce grup metylowych wprowadzono grupy hydrofilowe (spolimeryzowane grupy tlenku etylenu) lub bardziej reaktywną grupę benzenową, proces biodegradacji rozpoczynał się od rozkładu kationu.

## LITERATURA

- [1] Anastasiu S., Jelescu E.: Środki powierzchniowo czynne. WNT, Warszawa 1973.
- [2] Anonim :Symposium "Cationic Surfactants and Environment" Summary. Tenside - Detergents 19, 183, 1982.
- [3] Adair F.W., Geftic S.G., Gelser J.: Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. 1. Cross in benzalkonium chloride solution. Appl. Microbiol. 18, 299, 1969. ref. Stawska S.S., Udod W.M., Taranova Ł.A., Kriwec I.A.: Mikrobiologiczyczna oczyszczka wody ot powierzchniowoaktywnych wieszczestw. Naukowa Dumka, Kijew 1988.
- [4] Alpert L. i inni: Spektroskopia w podczerwieni. PWN, Warszawa 1974.
- [5] Arkadijewa Z.A., Trifonowa T.W., Agapowa N.S., Kozłowa E.I.: Izuczenije mikroorganizmow aktywnogo iła, uczastwujuszczich w razłożenii czietwiertnicznogo ammoniewogo sojedinenija imidazolina. Naucz. Dokł. Wyssh. Szk. Bioł. Nauki. 7. 113, 1976. ref. Stawska S.S., Udod W.M., Taranova Ł.A., Kriwec I.A.: Mikrobiologiczyczna oczyszczka wody ot powierzchniowoaktywnych wieszczestw. Naukowa Dumka, Kijew 1988.
- [6] Baleux B., Caumette P.: Biodegradation de quelques agent de surface cationiques. Water Research. 11, 833, 1977.
- [7] Bożko L., Rzechowska E.: Biodegradacja substancji powierzchniowo czynnych głównie niejonowych. Postępy Mikrobiologii 13, z.2, 189, 1972.
- [8] Bożko L., Rzechowska E.: Metody określania biodegradacji



- substancji powierzchniowo czynnych. *Postępy Mikrobiologii* **13**, z.2, 212, 1972.
- [9] Challis B.C.:N-nitrosoamine contaminants in surfactants III Surf. Cong. Section F, 138, London 1992.
- [10] Clancy S.F.,Tanner D.A.:Determination of surfactant biodegradability. 201st American Chemical Society National Meeting, 131. Atlanta, Georgia April 14-19, 1991.
- [11] Cook K.A.:Diodegradation of the non-ionic surfactant Do-banol 45-7 by activated sludge.*Water Research.* **13**, 259, 1979.
- [12] Dojlido J.:Metody pomiaru biodegradacji. Nowa Technika w Inżynierii Sanitarnej s.Wodociągi i Kanalizacja z.15, 39, 1982.
- [13] Fenger B.H.,Mandrup M.,Rohde G.,Sorensen J.,C.:Degradation of cationic surfactant in activated sludge pilot plants. *Water Research.* **7**, 1195, 1973.
- [14] Grabińska Sota E.,Zdybiewska M.:Ocena metod stosowanych przy biodegradacji na podstawie wybranych kationowych SPC. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna* **58**, 60, 1984.
- [15] Grabińska-Sota E.:Budowa kationowych substancji powierzchniowo czynnych jako czynnik decydujący o możliwości ich rozkładu na drodze biologicznej.Materiały Ogólnopolskiego Sympozjum "Biotechnologia Środowiskowa",8,Rudy Raciborskie 1990.
- [16] Günther H.:Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. PWN, Warszawa 1983.
- [17] Haman W.:Propozycje opracowania metod testowego badania biodegradacji substancji powierzchniowo czynnych nie dających typowych reakcji analitycznych. Materiały na VI Konferencję Naukową :Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych,Wydawnictwo Pol.Wroc.,Seria Konferencje nr 11,46, Wrocław 1981.
- [18] Hellmann H.: Einsatz der IR-Spektroskopie beim Abbau organischer Stoffe.I Mitteilung:Anionische und nichtionische

- Tenside. *Z. Wasser Abwasser Forsch.* **15**, Nr.1, 15, 1982.
- [19] Hellmann H.:Einsatz der IR Spektroskopie beim Abbau organischer Stoffe.III Mitteilung:Kationtenside.*Z. Wasser Abwasser Forsch.* **16**, 174, 1983.
- [20] Hellmann H.:Technik der IR Spektroskopie beim Nachweis, Identifizierung und quantitativer Bestimmung organischer Stoffgemische im wässrigen Milieu.Seminar Neure Entwicklugen und Erfahrungen auf dem Gebiet Der Photometrie und Spektroskopie (UV und IR) in der Adwendung auf Wasser,Abwasser und Schlämme. 245, Aachen 1985.
- [21] Hellmann H.:Aufgabe und Einsatz der IR-Spektroskopie im Rahmen der Tensidanalytik in Abwasser und in Gewässern. *Vom Wasser* **66**, 111, 1986.
- [22] Hermanowicz W.,Dożańska W.,Dojlido J.,Koziorowski B.: Fizyczno chemiczne badania wody i ścieków.Arkady, Warszawa 1976.
- [23] Ilič P.:Verhalten einer schwer abbaubaren Modeellsubstanz bei der biologischen Reinigung.GWF-Wasser/Abwasser **119**, 127,1978.
- [24] Janosz-Rajczyk M.,Owsiak M.: Wpływ Emulkopu na proces oczyszczania metodą osadu czynnego.Materiały na VI Konferencję Naukową:Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych,Wydawnictwo Pol.Wroc.,Seria Konferencje nr 11,49, Wrocław 1981.
- [25] Janosz-Rajczyk M.:Ocena procesu adaptacji drobnoustrojów do wybranych kationowych związków powierzchniowo czynnych .Materiały Zjazdu Naukowego PTCh i SITPCh, zeszyt D,636 Lublin 1982.
- [26] Janosz-Rajczyk M.,Halka J.:Ocena procesu biodegradacji preparatów zawierających kationowo aktywne substancje powierzchniowe.Materiały na VII Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol. Wroc.,Seria Konferencje nr 13,40, Wrocław 1984.



- [27] Janosz-Rajczyk M.: Usuwanie trudno rozkładalnych substratów na przykładzie kationowo aktywnych SPC. Materiały na Konferencję Naukową :Wysokoefektywne Metody Oczyszczania Ścieków i Odnowa Wody.Zeszyty Naukowe Pol. Krak., Monografia 34, Część II,161, Kraków 1985.
- [28] Janosz-Rajczyk M.,Jurkiewicz St.,Szeja W.:Próby określenia substancji hamujących utlenianie wybranych kationowych substancji powierzchniowo czynnych w procesie ich biodegradacji.Materiały XXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 29, Katowice 1986.
- [29] Janosz-Rajczyk M.:Biodegradacja kationowych substancji powierzchniowo czynnych.Materiały na IX Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol.Wroc.,Seria Konferencje nr 17,43, Wrocław 1988.
- [30] Janosz-Rajczyk M.: Wykorzystanie techniki widmowej IR i  $^1\text{H}$  NMR do badań biodegradacji trudno rozkładalnych substratów na przykładzie KSPC. Archiwum Ochrony Środowiska 3-4, 47, 1992.
- [31] Janosz-Rajczyk M. :Możliwości adaptacyjne drobnoustrojów do wybranych KSPC. Z. Nauk. Pol.Śl. s. Inżynieria Środowiska (w druku).
- [32] Janosz-Rajczyk M.:Oczyszczanie ścieków zawierających niejonowe i kationowe związki powierzchniowo czynne. Z.Nauk. Pol.Śl. s. Inżynieria Środowiska (w druku).
- [33] Janosz-Rajczyk M.:Evaluation of the biodegradation of sparingly decomposable substrates using IR and  $^1\text{H}$  NMR spectral techniques. Vom Wasser 77, 21, 1991.
- [34] Janosz-Rajczyk M.: Biodegradation of Alkildipolyethoxybenzylammonium Chloride. Tenside-Detergants 29, 436, 1992.
- [35] Janota-Bassalik L.,Olczyk C.,Kaczorowska M.:Degradation of some cationic detergents by *Pseudomonas pictorum*. Acta Microb.Polon.18.31 1969. ref. Baleux B., Caumette P.: Biode-

gradation de quelques agent de surface cationiques. Water Research .11, 833, 1977.

- [36] Jerzykiewicz W.,Krasnodębski Z.,Bekierz G.:Własności użytkowe krajowych kationowych środków powierzchniowo czynnych.Materiały na IV Konferencję Naukową:Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol.Wroc., Seria Konferencje nr 9, 47, Wrocław 1978.
- [37] Jerzykiewicz W.,Krasnodębski Z.,Bekierz G.:Aminy tłuszczowe i ich pochodne. Przemysł Chemiczny, 57, 289, 1978.
- [38] Kędzia W.,Muszyński Z.,Mirska I.,Nowak B.: Właściwości biologiczne amin tłuszczowych i ich pochodnych czwartorzędowych soli amoniowych. Wydawnictwo Akad. Med., Poznań 1984.
- [39] Łebkowska M.: Stan i perspektywy rozwoju metod badań toksyczności i biodegradacji. Biotechnologia 1,39,1992.
- [40] Łukinych N.A.:Oczistka stocznych wód, sodierzaszczich sintieticzeskije powierhnostnoaktiwnyje wieszcziestwa.Stroizdat, Moskwa 1972.
- [41] Miksch K.:Primienienie opriedielenia diegidrogenazowoj aktiwnosti aktiwnogo iła w issliedowanijach po biodegradacji PAW.Trudy VII Mieždunarodnogo Kongressa po Powierhnostnoaktiwnym Wieszczestwam. T.2, 82, Moskwa 1978.
- [42] Miksch K.:Wpływ wybranych substancji powierzchniowo czynnych (SPC) na kinetykę procesu osadu czynnego. Materiały na VI Konferencję Naukową:Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol.Wroc., Seria Konferencje nr 11, 49, Wrocław 1981.
- [43] Miksch K.:Aktywność fizjologiczna drobnoustrojów w procesie osadu czynnego. Z.Nauk.Pol. Śl.s.Inżynieria Sanitarna z. 24 Gliwice 1983.
- [44] Moskal J.,Pawlaczyk-Szpilowa M.:Badania porównawcze nad aktywnością metaboliczną bakterii opornych i wrażliwych oraz ich wykorzystanie do biodegradacji związków powierzchniowo czynnych typu pluroników i tetroników.Materiały na VI Konfe-



rencję Naukową :Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol.Wroc., Seria Konferencje nr 11, 44, Wrocław 1981.

[45] Neufart P. i inni: Biologische Eliminierung von Kationensiden sowie deren ökologisches Verhalten .Trudy VII Międzynarodowego Kongressa po Powierzchnoaktywnym Wieszczestwam. T.2, 116, Moskwa 1978.

[46] Pawlaczyk-Szpilowa M., Dziendziel E.: Degradacja biologiczna surfaktantów typu tetroników w warunkach stacjonarnych. Materiały na VI Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol.Wroc., Seria Konferencje nr 11, 45, Wrocław 1981.

[47] Pernak J., Grabińska E., Zdybiewska M.: Zdolność do biodegradacji chlorków alkilotiometyloamoniowych. Przemysł Chemiczny 61, 30, 1982.

[48] Pitter P. i inni : Biologische Abbaubarkeit kationaktiver Tenside. Trudy VII Międzynarodowego Kongressa po Powierzchnoaktywnym Wieszczestwam. T. 2, 82, Moskwa 1978.

[49] Pitter P.: Vliv sulfoskupiny na biologickou rozložitelnost aromatických látek ve vodách. Chemický průmysl 34/59, 6, 319, 1984.

[50] Pitter P.: Correlation of microbial degradation rates with the chemical structure. Acta hydrochim. hydrobiol. 13, 4, 453, 1985.

[51] PN-72/ C-04550 Arkusz 09 : Woda i ścieki. Badania zawartości substancji powierzchniowo czynnych oraz ich biochemicznego utleniania. Oznaczanie efektywności biochemicznego utleniania anionowych i niejonowych syntetycznych substancji powierzchniowo czynnych metodą osadu czynnego w warunkach kinetycznych.

[52] PN-72/ C-04550 Arkusz 10: Woda i ścieki. Badania zawartości substancji powierzchniowo czynnych oraz ich biochemicznego utleniania. Oznaczanie efektywności biochemicznego ut-

leniania anionowych i niejonowych syntetycznych substancji powierzchniowo czynnych metodą osadu czynnego w warunkach statycznych.

[53] PN-72/ C-04550 Arkusz 10: Woda i ścieki. Badania zawartości substancji powierzchniowo czynnych oraz ich biochemicznego utleniania. Oznaczanie biodegradacji anionowych substancji powierzchniowo czynnych test wstępny.

[54] Przewłocki J.: Oznaczanie aktywności osadu czynnego. Gaz Woda i Tech. Sanit. 44, 133, 1970.

[55] Różycka-Roszak B. et al.: Micelle hydration by H NMR. Colloid & Polymer Science 267, 831, 1989.

[56] Sheers E.H., Wehner D.C., Sauer G.F.: Biodegradation of a sulfonated amide surfactant. Journal WPCF. 39, 1410, 1967.

[57] Stawska S.S., Udod W.M., Taranowa Ł.A., Kriwec I.A.: Mikrobiologiczieskaja oczistka wody ot powierzchnoaktywnych wieszczestw. Naukowa Dumka, Kijew 1988.

[58] Sullivan D.E.: Biodegradation of a cationic surfactant in activated sludge. Water Res. 17, 1145, 1983.

[59] Swisher R.D.: Surfactant biodegradation. Marcel Dekker, New York 1987.

[60] Szafran M., Dega-Szafran Z.: Określanie struktury związków organicznych metodami spektroskopowymi. PWN, Warszawa 1988.

[61] Taranowa Ł.: Mikrobnaja destrukcja kationnych PAW. Dostizhenija mikrobiologii w praktike : Tiez doklada VII Siezda Wsiesojuznoj Mikrobiologii. Alma Ata, Ijuń 1985. ref. Stawska S.S., Udod W.M., Taranowa Ł.A., Kriwec I.A.: Mikrobiologiczieskaja oczistka wody ot powierzchnoaktywnych wieszczestw. Naukowa Dumka, Kijew 1988.

[62] Wagner I.R.: Methoden zur Prüfung der biochemischen Abbaubarkeit chemischer Substanzen. VCH, Weinheim 1988.

[63] Waters J., Kupfer W.: The determination of cationic surfactants in the presence of anionic surfactant in biodegradation test liquors. Analytica Chimica Acta 85, 241, 1976. ref.



Swisher R.D.: Surfactant biodegradation. Marcel Dekker, New York 1987.

[64] Praca zbiorowa: Tenzidy. Alfa, Bratislava 1977.

[65] Praca zbiorowa: Spektroskopowe metody badania struktury związków organicznych. Skrypt Pol. Śl. nr 1415, Gliwice 1989.

[66] Zdybiewska M., Sznyrowski L., Kuszniak W.: Wpływ wybranych detergentów na fermentację osadów. Materiały XIV Konferencji Naukowo-Technicznej, 327, Katowice 1971.

[67] Zdybiewska M., Janosz-Rajczyk M., Madaler Z., Miksch K.: Współzależność między budową związków powierzchniowo czynnych a ich podatnością na biodegradację na przykładzie 12 preparatów niejonowych. Materiały na III Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol. Wroc., Seria Konferencje nr 5, 21, Wrocław 1976.

[68] Zdybiewska M., Kwiatkowska K., Nanke B.: Próby ustalenia podatności na biodegradację i toksyczność wybranych kationowo aktywnych substancji powierzchniowo czynnych. Materiały na IV Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol. Wroc., Seria Konferencje nr 9, 55, Wrocław 1978.

[69] Zdybiewska M., Janosz-Rajczyk M.: Wpływ wybranych kationowo czynnych związków powierzchniowo czynnych na mieszane populacje drobnoustrojów osadu czynnego i obrostów biologicznych. Materiały na IV Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol. Wroc., Seria Konferencje nr 9, 58, Wrocław 1978.

[70] Zdybiewska M.: Wpływ substancji powierzchniowo czynnych na zanieczyszczenie środowiska i sposoby zapobiegania. Fizykochemiczne metody oczyszczania wody i ścieków, Wydawnictwo Pol. Wroc., Seria Studia i Materiały, zeszyt 20, 137, Wrocław 1978.

[71] Zdybiewska M., Janosz-Rajczyk M.: Wspólne oczyszczanie ścieków zawierających kationowe i niejonowe substancje powierzchniowo czynne. Materiały na VI Konferencję Naukową:

Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol. Wroc., Seria Konferencje nr 11, 50, Wrocław 1981.

[72] Zdybiewska M., Janosz-Rajczyk M.: Ocena biodegradacji substancji powierzchniowo czynnych na podstawie pomiaru aktywności oddechowej osadu czynnego. Materiały na VI Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol. Wroc., Seria Konferencje nr 11, 51, Wrocław 1981.

[73] Zdybiewska M., Janosz-Rajczyk M.: Biodegradacja kationowo aktywnych związków powierzchniowych. Materiały na sympozjum: Biodegradacja i toksyczność substancji zanieczyszczających wody powierzchniowe, 143, Radziejowice 1981.

[74] Zdybiewska M., Grabińska E., Tarniowy J.: Badania nad biodegradacją i toksycznością wybranych związków powierzchniowo czynnych. Materiały na sympozjum: Biodegradacja i toksyczność substancji zanieczyszczających wody powierzchniowe, 133, Radziejowice 1981.

[75] Zdybiewska M., Janosz-Rajczyk M.: Możliwości oczyszczania ścieków zawierających niejonowe związki powierzchniowo czynne. Materiały na Konferencję Naukową: Wysokoefektywne Metody Oczyszczania Ścieków i Odnowa Wody. Zeszyty Naukowe Pol. Krak. Monografia 34, Część II, 231, Kraków 1981.

[76] Zdybiewska M.: Porównanie metod stosowanych do oznaczania toksyczności i podatności na biodegradację substancji powierzchniowo czynnych. Materiały na VII Konferencję Naukową: Chemia i Technologia Środków Powierzchniowo Czynnych, Wydawnictwo Pol. Wroc., Seria Konferencje nr 13, 40, Wrocław 1983.

[77] Zdybiewska M.: Chemizm biodegradacji anionowych substancji powierzchniowo czynnych i produkty metabolizmu. Z. Nauk. Pol. Śl. s. Inżynieria Sanitarna z. 25, 77, Gliwice 1984.

[78] Zdybiewska M., Rzczycka M., Tarniowy J.: Efektywność usuwania głównych grup substancji powierzchniowo czynnych (SPC) z wody i ścieków. Materiały na Konferencję Naukową: Wysokoefek-



tywne Metody Oczyszczania Ścieków i Odnowa Wody. Zeszyty Naukowe Pol.Krak., Monografia 34, Część II, 151, Kraków 1985.

[79] Zgirski A., Gondko R.: Obliczenia biochemiczne. PWN, Warszawa 1976.

[80] Żabowski J. Zeszyty Naukowe IGK 27, 1, 1969. ref. Bożko L., Rzechowska E.: Biodegradacja substancji powierzchniowo czynnych głównie niejonowych. Postępy Mikrobiologii 13, z.2, 189, 1972.

## BIODEGRADACJA KATIONOWYCH SUBSTANCJI POWIERZCHNIOWO CZYNNYCH

### S t r e s z c z e n i e

Badania prowadzono w celu określenia wpływu testowanych KSPC na biodegradację łatwo utlenialego substratu, wpływu struktury KSPC na biodegradację, przedstawienia możliwego do przyjęcia mechanizmu degradacyjnego badanych substancji.

Biodegradację prowadzono w instalacjach modelowych do ciągłej hodowli drobnoustrojów osadu czynnego w czterech etapach. Kolejno przewidywano zasilanie drobnoustrojów łatwo utlenialego substratem, adaptację mikroorganizmów do testowanych substancji, dozowanie KSPC w stężeniu  $20.0 \text{ mg/dm}^3$  i prowadzenie zasadniczych pomiarów biochemicznych i analiz spektroskopowych. Ostatni etap przewidywał zasilanie drobnoustrojów badanymi preparatami w warunkach gdy stanowiły podstawowe źródło węgla i azotu oraz ponowne wykonywanie spektroskopowych analiz.

Stwierdzono, że testowane KSPC należały do trudno rozkładalnych substancji i spowalniały proces biodegradacji substratu łatwo utlenialego a mechanizm biodegradacji związany był z rodzajem podstawników występujących przy czwartorzędowym azocie.

Dowiedziano, że dla tych KSPC, w których przy azocie amoniowym występował łańcuch węglowodorowy i spolimeryzowane grupy tlenu etylenu lub łańcuch wieloeterowy i grupa benzenowa biodegradacja rozpoczynała się od rozkładu kationu. Dochodziło do utleniania azotu amoniowego, podstawnika ben-



zenowego i łańcucha wieloeterowego, nie zachodziła oksydacja łańcuchów węglowodorowych wówczas, gdy w cząsteczce występowała grupa benzenowa. Wykazano, że dla tych KSPC, które przy azocie amoniowym posiadały trzy grupy metylowe i łańcuch węglowodorowy biodegradacja rozpoczynała się od oksydacji łańcucha węglowodorowego.

## BIODEGRADATION OF CATIONIC SURFACE-ACTIVE AGENTS

### S u m m a r y

Investigations were conducted to determine the effect of tested CSAAs on the biodegradation of a readily oxidizable substrate, the influence CSAAs on biodegradation, a presentation of acceptable degradation mechanism in substances under examination.

Biodegradation was carried out in model installations used for continuous bacterial culture of activated sludge in four stages. In succession it was provided for feeding the microorganisms with readily oxidizable substrate, adaptation of microbes for the tested substances, CSAAs batching in a concentration of  $20.0 \text{ mg/dm}^3$  and conducting basic biochemical and spectroscopic analyses. The last stage anticipated the supply of microorganisms with tested preparations under condition when they provided the single carbon and nitrogen source, and making again the spectroscopic analyses.

It has been found that the tested CSAAs belonged to sparingly decomposable substances and slowed down the biodegradation process of readily oxidizable substrate, and the biodegradation mechanism was connected with the type of substituents at quaternary nitrogen atom.

IT has been proved that for those CSAAs in which hydrocarbon chain and polymerized groups of ethylene oxide



or multi ether chain and a benzene group occurred at ammonia nitrogen, the biodegradation started with decomposition of cation. The oxidation of ammonia nitrogen, benzene substituent and multi ether chain was carried into effect, however, oxidation of hydrocarbon chains did not occur, when the benzene group occurred at ammonia nitrogen. It has been shown that biodegradation started with hydrocarbon chain oxidation in those CSAAs which had three methyl groups and hydrocarbon chain at the ammonia nitrogen.

## БИОДЕГРАДАЦИЯ КАТИОННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

### Резюме

Проведены исследования с целью определения влияния испытуемых КПАВ на биодegradацию легкоокисляющегося субстрата, влияние структуры КПАВ на биодegradацию, представление приемлемого механизма дegradации испытуемых веществ.

Биодegradацию проводили в модельных установках для непрерывного выращивания микробов активного ила в четыре этапа. Последовательно предусматривали питание микробов легкоокисляющимся субстратом, адаптацию микробов к испытуемым веществам, дозировку КПАВ концентрацией 20,0 мг/дм<sup>3</sup> и проведение основных биохимических измерений и спектроскопных анализов. Последний этап предусматривал питание микробов испытуемыми препаратами в условиях, когда они являлись единственным источником углерода и азота, и повторное проведение спектроальных анализов.

Выявлено, что испытуемые КПАВ принадлежат к трудноразлагаемым веществам и замедляют процесс биодegradации легкоокисляющегося субстрата, а механизм биодegradации связан с видом заместителей при четвертичном азоте.

Доказано, что для тех КПАВ, в которых с аммониевым азотом была соединена углеводородная цепь и полимеризованные группы окиси этилена или многозвирная цепь и бензольная группа, биодegradация начиналась с разложения катиона. Окислялся аммониевый азот, бензольный заместитель и многозвирная цепь, не происходила оксидация углеводородных цепей. Доказано, что для тех КПАВ, в которых при аммониевом азоте имеются три метильные группы и углеводородная цепь, биодegradация начиналась оксидацией углеводородной цепи.



BIBLIOTEKA GŁÓWNA  
Politechniki Śląskiej

P. 3356 / 94 / 37