

B. LALEVIĆ¹, D. DABIĆ²
V. RAIČEVIĆ¹, D. KIKOVIĆ³
LJ. JOVANOVIĆ⁴, M. NIKŠIĆ¹

Originalni naučni rad
UDC:620.193.8:667.6=861

Degradacija različitih koncentracija MTBE-a pomoću *Mucor hiemalis*

Poslednjih 20 godina intenzivna upotreba metil tercijarnog butil etra (MTBE) dovela je do povećanja njegovog prisustva u čovekovo sredini. Agencija za zaštitu čovekove sredine (EPA) okarakterisala je MTBE kao potencijalno kancerogeno jedinjenje i predložila metode za njegovo uklanjanje iz prirodnih sredina.

Bioremedijacija predstavlja svetski trend u razvoju tehnologija remedijacije i sastoji se od kompleksa procesa koji podrazumevaju korišćenje različitih vrsta mikroorganizama. Mikroorganizmi su, zahvaljujući svojim fermentnim sistemima, sposobni da koriste različita organska jedinjenja kao jedinstven izvor ugljenika i energije i transformišu ih do netoksičnih produkata.

Cilj rada bio je ispitivanje degradacije različitih koncentracija MTBE-a (76, 100, 438 i 746 ppm) pomoću *Mucor hiemalis* 139ž. Ovaj izolat izolovan je iz zemljišta NIS Rafinerije nafte Pančevo, kontaminiranog organskim zagađivačima. Proces degradacije praćen je u toku 8 dana inkubacije pri aerobnim uslovima. Degradacija MTBE-a praćena je pomoću gasnog hromatografa sa plamen jonizujućim detektorom (GC/FID). Posle 12 sati inkubacije došlo je do smanjenja koncentracije MTBE-a. Stepenn degradacije MTBE-a posle 8 dana se kretao u intervalu od 47-76% od početne koncentracije. Stepenn degradacije zavisio je od početne koncentracije MTBE-a. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost primene autohtonog izolata *Mucor hiemalis* 139ž u procesima bioremedijacije zemljišta i voda, kao ekološki, ekonomski i energetska prihvatljiv metod remedijacije.

UVOD

Porast stanovništva, intenzivna industrijalizacija i urbanizacija uslovile su zagađenje čovekove sredine, pre svega zagađenje zemljišta i voda. Među najznačajnije zagađivače ubraja se petrohemijska industrija, koja generiše velike količine otpadnog toksičnog materijala u čvrstom ili tečnom stanju. Većina tih materija ima kancerogeno dejstvo, koje se svakim danom ispuštaju u različite recipijente. U ovu grupu ubrajaju se i benzinski oksigenati, od kojih je najpoznatiji methyl tert-butyl ether (MTBE). Ovo jedinjenje je uvedeno u proizvodnju 70-ih godina XX veka u cilju povećanja efikasnosti sagorevanja, redukcije zagađenja vazduha (Bonjar, 2004), povećanja oktanskog broja benzina i smanjenje emisije CO₂ iz motora sa unutrašnjim sagore-

vanjem (Fiorenza i Rifai, 2003). Posle svega nekoliko godina intenzivne upotrebe, MTBE je postao jednim od najčešće detektovanih polutanata u podzemnim vodama SAD-a (Schmidt i sar., 2004; Baehr i sar., 1999) i Evrope (Klinger i sar., 2002). MTBE u vrlo malim koncentracijama izaziva promenu ukusa, odnosno mirisa pijaće vode (2, odnosno 2,5 ppb), tako da je Američka agencija za zaštitu čovekove sredine (USEPA) determinisala maksimalno dozvoljeni nivo MTBE-a u vodi za piće na 20-40 µg/l. Ubrzo je predložen niz mera za uklanjanje MTBE-a iz prirodnih sredina, a jedna od njih je i bioremedijacija.

Cilj ovog rada bio je ispitivanje sposobnosti gljive *Mucor hiemalis* izolat 139ž da vrši degradaciju različitih koncentracija MTBE-a u laboratorijskim uslovima.

MATERIJAL I METODE

MTBE korišćen u ovim istraživanjima dobijen je iz NIS Rafinerije nafte Pančevo.

Adresa autora: ¹ Faculty of agriculture, Belgrade, Nemanjina 6, Zemun, ² Oil refinery Pančevo, Spoljnostarčevačka 192, Pančevo, ³ Faculty of Agriculture, Lešak, Kopaonička bb, Lešak, ⁴CMS, Kneza Višeslava, Belgrade

Izolat *Mucor hiemalis* 139ž izolovan je iz zemljišta pored bazena Bistrik u okviru NIS Rafinerije nafte Pančevo. Ovaj izolat je gajen na podlozi roze bengal streptomycin agar pod aerobnim uslovima na temperaturi od 26°C.

MTBE je za ova istraživanja prethodno rastvoren u metanolu (1:10).

Ogled je postavljen inokulacijom tečne mineralne podloge MSM (Hardison i sar., 1997) sporama gljiva *Mucor hiemalis* 139ž ($9,5 \times 10^6$). U mineralnu podlogu, nakon sterilizacije, dodat je MTBE u koncentracijama od 76, 100, 438 i 746 ppm).

Određivanje koncentracija MTBE-a je vršeno metodom gasne hromatografije sa plamen jonizujućim detektorom i kapilarnom kolonom (GC/FID).

Inkubacija je obavljena na temperaturi od 26°C na šejkeru (120 obrtaja/min), osam dana.

Ispitivanje stepena degradacije obavljeno je posle 12 sati, 6 i 8 dana od početka ogleda.

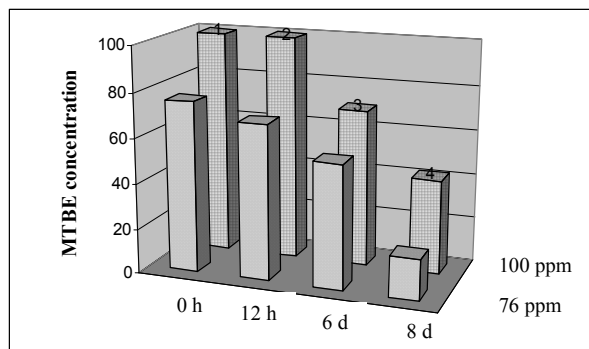
REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA

Poznat je veći broj bakterijskih sojeva koji u aerobnim i anaerobnim uslovima razgrađuju MTBE, koristeći ga kao jedinstven izvor ugljenika i energije (Lalević i sar., 2005; Deeb i sar., 2000; Hanson i sar., 1999; Mo i sar., 1997).

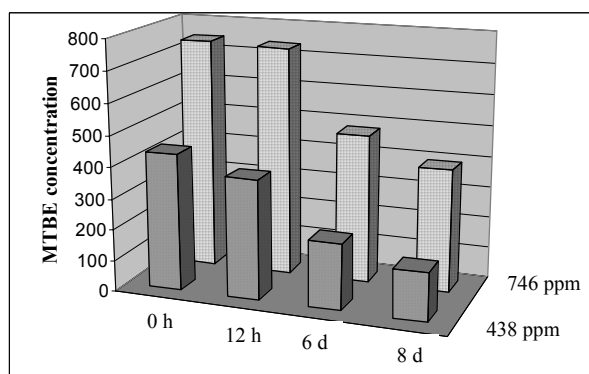
Pored bakterija, i gljive imaju sposobnost degradacije MTBE-a (Curry i sar., 1996; Hardison i sar., 1997).

Rezultati ovih istraživanja ukazuju da gljiva *Mucor hiemalis* izolat 139ž u uslovima rasta na mineralnoj podlozi može da obavlja degradaciju MTBE-a (grafikoni 1, 2). Stepenn degradacije zavisi je od početne koncentracije MTBE-a i vremena inkubacije (tabela 1). Rezultati Hardisona i sar. (1997) ukazuju da gljiva *Graphium sp.* takođe može da kometabolitički degradira methyl tert-butyl ether (MTBE). Degradacija MTBE-a se završava stvaranjem tercijarnog butil formata (TBF) i tercijarnog butil alkohola (TBA). Inhibicija degradacije u prisustvu alkena i alkena ukazuje da se u proces degradacije uključuje citohrom P-450 monooksigenaza.

Početnu koncentraciju MTBE-a od 76ppm *Mucor hiemalis* 139ž je u periodu od 8 dana smanjio za 76%, dok je koncentraciju od 100 ppm smanjio za 58% (grafikon 1).



Grafikon 1 - Stepenn degradacije MTBE-a pomoću *Mucor hiemalis* 139ž (76 i 100 ppm)



Grafikon 2 - Stepenn degradacije MTBE-a pomoću *Mucor hiemalis* 139ž (438 and 746 ppm)

Dobijeni rezultati jasno ukazuju da je gljiva *Mucor hiemalis* izolat 139ž uticala na smanjenje koncentracije MTBE-a u svim ispitivanim varijantama ogleda. Procentualno smanjenje koncentracije MTBE-a se povećavalo sa dužinom trajanja ogleda, a stepenn degradacije je zavisio od početnih koncentracija MTBE-a. Najmanji procenat degradacije MTBE-a zabeležen je 12 sati od početka ogleda (1-13%), dok je najveći stepenn smanjenja sadržaja MTBE-a konstatovan nakon osmog dana od početka ogleda (47-76%, tabela 1). Prethodna istraživanja pokazala su da je degradacija MTBE-a usporena pri početnim koncentracijama MTBE-a većim od 200 mg/l (Mo et al., 1997; Park and Cowan, 1997).

Tabela 1 - Procentualno smanjenje koncentracije MTBE-a (%)

Početna koncentracija	12 h	6 dana	8 dana
76ppm (100%)	9	28	76
100ppm (100%)	0	30	58
438ppm (100%)	13	51	74
746ppm (100%)	1	36	47

Najveću efikasnost ispitivani izolat je ispoljio pri manjim koncentracijama MTBE-a, što je u skladu sa rezultatima Lalevića i sar. (2005).

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja i njihove analize, može se konstatovati sledeće:

1. Gljiva *Mucor hiemalis* izolat 139ž koristi MTBE-a kao jedinstven izvor ugljenika i energije.
2. Stepen degradacije zavisi od dužina inkubacije i početne koncentracije MTBE-a.
3. Gljiva *Mucor hiemalis* izolat 139ž se može koristiti u procesima bioremedijacije zemljišta i voda zagađenih MTBE-om.

Ova istraživanja su urađena u okviru projekta TR 6923B finansiranog od strane Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine i participanta NIS Rafinerije nafte Pančevo.

LITERATURA

- [1] Baehr, A. L., Stackelberg, P. E., Baker, R. J. (1999): Evaluation of the atmosphere as a source of volatile organic compounds in shallow groundwater. *Water Resources Research*, 35 (1), 127-136.
- [2] Curry, S. L., Ciuffetti, L. M., Hyman, M. R. (1996): Inhibition of growth of a *Graphium* sp. on gaseous *n*-alkanes by gaseous *n*-alkynes and *n*-alkenes. *Applied and environmental microbiology*, 62, 2198-2200.
- [3] Deeb, R. A., Sharp, J. O., Stocking, A., McDonald, S., West, K. A., Laugier M., Alvarez, P. J., Kavanaugh, M. C., Alvarez-Cohen, L. (2002): Impact of ethanol on benzene plume lengths: Microbial and modeling studies. *Journal of environmental engineering*, vol. 128, N. 9, 868-875.
- [4] Fiorenza, S., Rifai, H. S. (2003): Review of MTBE biodegradation and bioremediation. *Bioremediation journal*, 7 (1), 1-35.
- [5] Hanson, J. R., Ackerman, C. E., Scow, K. M. (1999): Biodegradation of methyl tert-butyl ether by a bacterial pure culture. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 65, N. 11, 4788-4792.
- [6] Hardison, L. K., Curry, S. S., Ciuffetti, L. M., Hyman, M. R. (1997): Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl tert-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Applied and environmental microbiology*, vol. 63, N. 8, 3059-3067.
- [7] Jovanović, Lj., Raičević, V., Dabić, D., Kiković, D., Cupać, S., Nešić, N., Morina, F., Lalević, B. (2006): Rizosferna degradacija organskih jedinjenja u zemljištu i vodama. «VIII YUCORR Korozija i zaštita materijala u industriji i građevinarstvu», Tara, zbornik radova, 218-223.
- [8] Klinger, J., Stieler, C., Sacher, F., Branch, H. J. (2002): MTBE (methyl tertiary-butyl ether) in groundwaters: monitoring results from Germany. *Journal of Environmental monitoring*, 4 (2), 276-279.
- [9] Lalević, B., Jovanović, Lj., Nikšić, M., Kiković, D., Raičević, V. (2005): Degradacija MTBE-a pomoću *Pseudomonas* bakterija. Konferencija «Saradnja istraživača različitih struka na području korozije i zaštite materijala», Tara, zbornik radova, 181-185.
- [10] Mo, K., Lora, C. O., Wanken, A. E., Javanmardian, M., Yang, X., Kulpa, C. F. (1997): Biodegradation of methyl t-butyl ether by pure bacterial cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 47, 69-72.
- [11] Park, K. and Cowan, R. (1997): Biodegradation of gasoline oxygenates. In: *In situ and on-site bioremediation. Proceedings of the 4th International In situ and On-site bioremediation symposium*. Vol. 1, Battelle Press, Columbus, Ohio.
- [12] Schmidt, T. C., Schirmer, M., Weiß, H., Haderlein, S. B. (2004): Microbial degradation of methyl tert-butyl ether and tert-butyl alcohol in the subsurface. *Journal of contaminant hydrology*, 70, 173-203.
- [13] Shahidi Bonjar, G. H. (2004): Streptomyces content of agricultural soils decreases by methyl tert-butyl ether (MTBE) spills and leakage, causing adverse change in soil micro flora. *Asian Journal of plant sciences*, 3 (1), 140-142.

ABSTRACT**DEGRADATION OF DIFFERENT MTBE CONCENTRATIONS BY *MUCOR HIEMALIS***

In the last twenty years there has been increased usage of metil tertiary butil eter (MTBE) which led to it's high presence in the environment. Environmental Protection Agency (EPA) has characterized MTBE as potentially cancerogenic substance and proposed the methods for it's removal from natural sources.

Bioremediation represents the worl trend in developing remediation technologies, and is a complex process which assumes using different microorganisams. The etheric bond in MTBE's molecule is persistant in the environment. Still, microorganisms are capable for using this organic compaund as carbon and energy source due to their various enzyme systems and transform it into non toxic products.

*The objective of this research is investigation of biodegradability of various concentrations of MTBE (76, 100, 438 and 746 ppm) by *Mucor hiemalis* 139ž. This strain has been isolated from the soil of NIS Oil Raffinery Pančevo, contaminated with organic pollutants. The degradation process was obsereved during 8 days of incubation in aerobic conditions. The MTBE's degradation was detected by gas chromatography with flame ionizing detector (GC/FID). After 12 hours of incubation the concentration of MTBE was reduced. The MTBE's reduction ranging form 47 to 76% from the initial concentration was detected after 8 days. The degradation level depended on the starting concentration of MTBE. These results indicate the possibility for using the authentic strain *Mucor hiemalis* in the bioremediation processes of soils and waters, as ecologically, economically and energetically sustainable remediation methods.*