ZESZYTY NAUKOWE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ 2000
Seria: INŻYNIERIA ŚRODOWISKA z. 45 Nr kol. 1487

Włodzimierz KOWALSKI, Dorota WOLICKA, Wojciech HOŁUB,
Magdalena PRZYTOCKA-JUSIAK*

Uniwersytet Warszawski
Instytut Geochemii, Mineralogii i Petrologii
02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 93
*Instytut Mikrobiologii
02-089 Warszawa, ul. Miecznikowa 1

BIOTRANSFORMACJA FOSFOGIPSU W HODOWLACH BEZTLENOWEJ MIKROFLORY NAMNAŻANEJ Z RÓŻNYCH ŚRODOWISK NA PODŁOŻACH Z ETANOLEM

Streszczenie. Poszukiwano bakterii redukujących siarczany, zdolnych do biotransformacji fosfogipsu w podłożu z etanolem, w dwóch środowiskach naturalnych i dwóch zanieczyszczonych produktami ropopochodnymi. Stwierdzono, że w beztlenowych hodowlach pochodzących ze środowisk zanieczyszczonych produkcja H_2S była większa niż w hodowlach mikroorganizmów pochodzących ze środowisk naturalnych. Maksymalną aktywność, wyrażoną szybkością biotransformacji fosfogipsu (0,35 g/L/dobę), stwierdzono w hodowli BRS pochodzącej z gleby zanieczyszczonej paliwem płynnym na podłożu Postgate z etanolem (około 50mM).

BIOTRANSFORMATION OF PHOSPHOGYPSUM IN ANAEROBIC CULTURES OF MICROFLORA FROM VARIOUS ENVIRONMENTS IN MEDIA WITH ETHANOL

Summary. A search was made for sulphate reducing bacteria capable of the biotransformation of phosphogypsum in medium with ethanol in two natural environments and two environments contaminated with crude oil-derived products. It was found that the production of H_2S in anaerobic cultures from contaminated environments was higher than in the cultures of micro-organisms from natural environments. The maximal activity, expressed by rate of phosphogypsum biotransformation (0.35 g/L/day), was found in SRB culture set up in Postgate medium containing ethanol in concentration approx. 50 mM from soil contaminated with liquid fuel.

WSTĘP

W Wizowie k. Bolesławca znajduje się hałda gromadząca około 2 mln ton fosfogipsu. Fosfogips jest produktem odpadowym, który powstawał podczas produkcji kwasu fosforowego z koncentratów apatytowych w Zakładach Chemicznych „Wizów". Hałda tego odpadu jest dość jednorodna, składa się bowiem w 95% z gipsu i niewielkich ilości bassanitu. Resztę stanowią nieprzereagowane resztki skały, niewypłukane kwasy i przypadkowe zanieczyszczenia [4].

Fosfogips ma silnie kwaśny odczyn, co powoduje, że jest on dla środowiska naturalnego uciążliwym odpadem przemysłowym. Dodatkowo rozpuszczanie się gipsu powoduje, że do gruntów przedostają się jony SO_4, które są jednym z ważniejszych akceptorów elektronów w procesie beztlenowego rozkładu materii organicznej.

W naturalnych środowiskach w wyniku beztlenowego rozkładu materii organicznej pojawiają się różne proste związki. Jednoczesna obecność tych związków i SO_4 oraz odpowiednio niski potencjał oksydoredukcyjny (<-100 mV) stwarzają warunki do namnożenia się bakterii redukujących siarczany [8].

Jednym z dostępnych dla bakterii redukujących siarczany (BRS) źródeł węgla jest etanol - produkt końcowy homo- i heterofermentacji cukrów. Korzystanie z etanolu przez BRS jest dość powszechne. Wśród źródeł węgla dostępnych dla tej grupy bakterii etanol jest wymieniany na trzecim miejscu po mleczanie i pirogronianie [1].

Niektóre gatunki BRS, jak np.*Desulfobacter postgatei*, mogą utleniać etanol całkowicie, a inne, jak np. *Desulfobulbus propionicus* czy *Desulfovibrio baculatus*, tylko do octanu. Bakterie całkowicie utleniające etanol mogą również wykorzystywać octan utleniając go do CO_2 [6].

Cecha wykorzystywania etanolu została dotychczas stwierdzona u ponad 30 gatunków i szczepów należących do 12 różnych rodzajów BRS. Wiedza o wykorzystywaniu etanolu przez większość z nich sprowadza się jednak do stwierdzenia tego faktu.

W dostępnej literaturze znaleziono zaledwie trzy prace dotyczące kinetyki wzrostu BRS w hodowlach stacjonarnych na podłożu z etanolem i siarczanami [5, 12, 10]. Dane uzyskane przez tych autorów są zebrane w poniższej tabeli.

W hodowlach ciągłych, w których nie kumuluje się toksyczny H_2S, wzrost BRS jest znacznie szybszy [12]. W laboratoryjnych hodowlach ciągłych prowadzonych w dwustopniowym złożu ekspandowanym, na podłożu z 3 g/L etanolu i 1,5 g/L SO_4, De Smul i wsp. [11] uzyskiwali wydajność usuwania siarczanów rzędu 10-12 g S/L/dobę.

Celem pracy było poszukiwanie w różnych środowiskach mikroorganizmów zdolnych do intensywnej biotransformacji fosfogipsu w podłożach z etanolem.

Tabela 1

Parametry kinetyczne wzrostu BRS w hodowlach stacjonarnych na podłożu z etanolem i siarczanami

BRS gatunek lub szczep	Stężenie etanolu (mM)	Stężenie siarczanów (mM)	Parametry kinetyczne	Pozycja literatury
Desulfovibrio 20020	20	10	$\mu_{maks.} = 0{,}036\ h^{-1}$ $Y_{mol} = 1{,}7\ g\ C_{kom.}/mol$	Kremer i wsp., 1988
Desulfovibrio gigas	20	10	$\mu_{maks.} = 0{,}088\ h^{-1}$ $Y_{mol} = 1{,}8\ g\ C_{kom.}/mol$	Kremer i wsp., 1988
Desulfovibrio gigas	5	5	$\mu_{maks.} = 0{,}023\ h^{-1}$ $Y_{mol} = 3{,}0\ g\ sm/mol$	Szewzyk i Pfennig, 1990
Desulfovibrio vulgaris Marburg	5	5	$\mu_{maks.} = 0{,}032\ h^{-1}$ $Y_{mol} = 2{,}6\ g\ sm/mol$	Szewzyk i Pfennig, 1990
Desulfovibrio desulfuricans Essex 6	5	5	$\mu_{maks.} = 0{,}018\ h^{-1}$ $Y_{mol} = 3{,}4\ g\ sm/mol$	Szewzyk i Pfennig, 1990
Desulfotomaculum orientis	5	5	$\mu_{maks.} = 0{,}033\ h^{-1}$ $Y_{mol} = 3{,}4\ g\ sm/mol$	Szewzyk i Pfennig, 1990
Desulfobulbus propionicus	5	5	$\mu_{maks.} = 0{,}033\ h^{-1}$ $Y_{mol} = 5{,}2\ g\ sm/mol$	Szewzyk i Pfennig, 1990
Desulfovibrio inopinatus	10	28	$Y_{mol} = 7{,}9\ g\ sm/mol$	Reichenbecher i Schink, 1997

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. Do badań użyto czterech zespołów beztlenowych bakterii namnożonych na podłożu z etanolem i fosfogipsem: dwóch z zaolejonej gleby (teren oczyszczalni rafinerii Płock S.A. i gleba skażona płynnym paliwem) i dwóch ze środowisk naturalnych (gleba ogrodowa i muł z Wisły) oraz jednego zespołu (mieszanka bakterii – M8), namnożonego na podłożu z mleczanem i fosfogipsem. Mieszanka różnych szczepów BRS (M8) została uzyskana w 1989 r. przez połączenie 8 hodowli bakterii namnożonych na podłożu z mleczanem z następujących środowisk (muł z Wisły [2 różne hodowle], gnojowica świńska, muł z Bałtyku [głębokość: 50 i 235 m], rdza z dzwonu wodorowego, ciepłe źródło ze Swoszowic i osad ze zbiornika wodoru zakładu produkującego półprzewodniki). Mieszanka ta przez cały czas hodowana była na podłożu z mleczanem.

Warunki hodowli. Hodowle stacjonarne o objętości 300 mL prowadzone były w butelkach poiniekcyjnych o objętości 330 mL, zamkniętych gumowymi korkami. Próbki do analiz pobierano strzykawkami lekarskimi osadzonymi na stałe w korkach. Wszystkie hodowle inkubowano w termostacie w temperaturze 30°C. Stosunek objętościowy inokulum do podłoża we wszystkich hodowlach wynosił 1:10.

Namnażanie bakterii w podłożu z etanolem. Próbki badanych środowisk mieszano z fosfogipsem, napełniano nimi plastikowe przeźroczyste naczyńka i zwilżano podłożem z etanolem. Następnie zamykano szczelnie nakrętką i inkubowano w temperaturze 30°C do pojawienia się wyraźnego zaczernienia (siarczek żelaza). Tak przygotowanym inokulum szczepiono hodowle namnażające. Omawiane w pracy wyniki dotyczą pasaży tych hodowli.

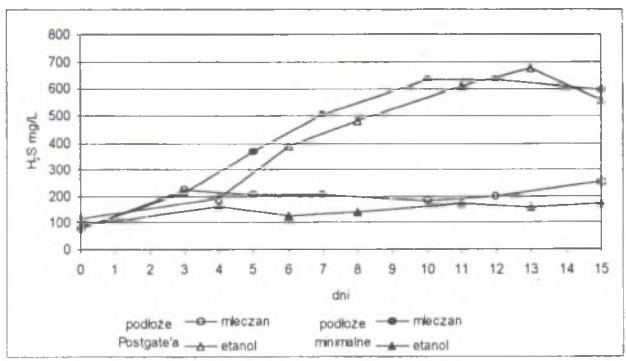
Podłoża. Stosowano podłoże minimalne o składzie (g/L): NH_4Cl (1,0), etanol (2,4), fosfogips (5,0) oraz optymalne dla wzrostu BRS podłoże C o składzie oryginalnym i zmodyfikowanym poprzez zastąpienie mleczanu etanolem, a Na_2SO_4 fosfogipsem w stężeniach ekwiwalentnych w przeliczeniu na węgiel i SO_4 [8].

Oznaczenia i przeliczenia wyników. Gęstość optyczną (OD) oznaczano przy długości fali 500 nm i przeliczano na mg suchej masy/L wg: 0,1 OD = 19,2 mg s.m./L [2], siarkowodór oznaczano metodą jodometryczną i przeliczano na zredukowane SO_4 zgodnie ze stechiometrią procesu - 1 mol H_2S powstaje w wyniku redukcji 1 mola SO_4 [8] i na fosfogips wg procentowej zwartości SO_4 w fosfogipsie ≈ 50% (badania własne); pH oznaczano stosując jako wskaźnik błękit bromotymolowy i skalę barwną. Etanol zużyty przez BRS szacowano teoretycznie wg: 2 mole C w związku organicznym na 1 mol zredukowanego SO_4 [3].

WYNIKI I DYSKUSJA

Fosfogips zawiera wszystkie pierwiastki (poza azotem) wymagane przez BRS w hodowlach z mleczanem [9]. Podłoże Postgate'a, do którego zamiast siarczanu sodu wprowadzano fosfogips (5 g/L), hamowało aktywność BRS, dlatego też w hodowlach BRS z mleczanem i fosfogipsem stosowano podłoże minimalne.

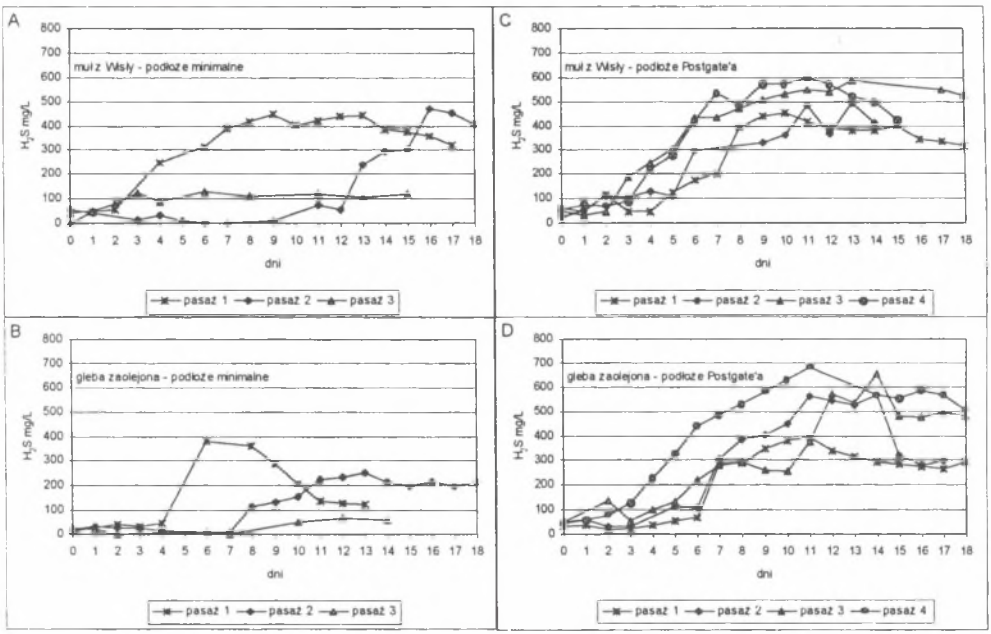
Przeniesienie hodowli (mieszanka 8 środowisk) namnożonej i wyselekcjonowanej na podłożu minimalnym z mleczanem na to samo podłoże, ale z etanolem, spowodowało znaczne ograniczenie aktywności BRS (minimalny przyrost H_2S). W równolegle prowadzonej hodowli na podłożu Postgate'a z etanolem uzyskano aktywność porównywalną z uzyskiwaną na podłożu minimalnym z mleczanem (rys.1).



Rys. 1. Aktywność BRS w hodowlach M8 na podłożu Postgate'a i minimalnym z fosfogipsem i etanolem lub mleczanem

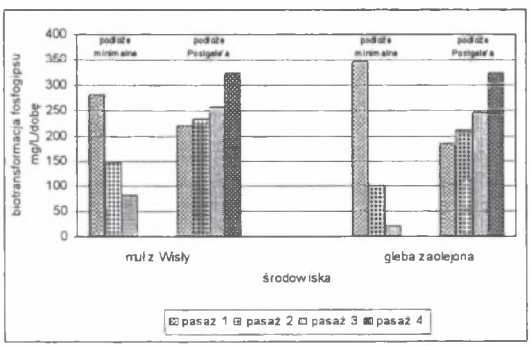
Fig. 1. SRB activity in M8 cultures in Postgate medium and minimal medium with ethanol or lactate

Podobne wyniki uzyskano przy namnażaniu BRS, z mułu Wisły i gleby skażonej paliwem samochodowym, na podłożach z etanolem. W kolejnych pasażach tych hodowli aktywność BRS sukcesywnie się zmniejszała (rys. 2A i B). Jedną z prawdopodobnych przyczyn tego zjawiska może być niedobór w hodowlach jakiegoś czynnika, który w kolejnych pasażach ulegał rozcieńczeniu wraz ze środowiskiem, w którym był zawarty. Natomiast w hodowlach mikroflory obu środowisk na podłożu Postgate'a z etanolem w kolejnych pasażach ilość wytwarzanych z fosfogipsu siarczków wzrastała (rys. 2C i D), co świadczyło o selekcjonowaniu się w tych hodowlach BRS.



Rys. 2. Aktywność BRS w kolejnych pasażach hodowli mikroflory namnażanej z gleby skażonej paliwem samochodowym i z mułu Wisły

Fig. 2. SRB activity in consecutive passages of cultures of microflora set up from soil contaminated with automobile fuel and sludge from the Vistula river



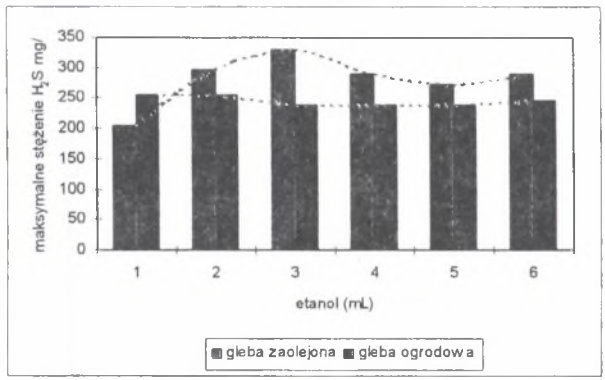
Rys. 3. Średnia ilość biotransformowanego fosfogipsu w kolejnych pasażach mikroflory badanych środowisk

Fig. 3. Mean amount of phosphogypsum biotransformed in consecutive passages of microflora from the studied environments

W hodowlach mikroorganizmów namnożonych z gleby skażonej paliwem samochodowym uzyskiwano nieco więcej H_2S niż w hodowlach namnożonych z mułu Wisły. Mimo to ilości fosfogipsu transformowanego w ciągu doby były podobne (rys. 3).

Opisywane w literaturze doświadczenia dotyczące wzrostu BRS w hodowlach z etanolem prowadzone przez różnych autorów są fragmentaryczne i dotyczą różnych gatunków BRS rosnących na mniej lub bardziej bogatych podłożach zawierających różne ilości zarówno etanolu, jak i siarczanów (tab. 1)

W naszych badaniach zastosowano zmodyfikowane podłoże Postgate z fosfogipsem (5g/L) jako źródłem siarczanów i etanolem w ilości od 1 do 6 mL/L we wzrastającym gradiencie co 1 mL (od około 17 do ponad 100 mM). Podłoże zaszczepiono mikroflorą pochodzącą z gleby ogrodowej i zaolejonej gleby pobranej z terenu rafinerii Płock SA na tym samym podłożu z 3 mL etanolu/L (piąty pasaż). W hodowlach szczepionych mikroflorą pochodzącą z gleby ogrodowej ilość siarczku wytwarzana we wszystkich hodowlach była nieomal identyczna, a w hodowlach mikroflory namnożonej z gleby zaolejonej nieco więcej siarczków obserwowano w obecności 3 mL etanolu/L. Ilość H_2S wytwarzana w hodowlach mikroflory pochodzącej z gleby zaolejonej była z reguły wyższa niż pochodzącej z gleby ogrodowej (rys. 4).

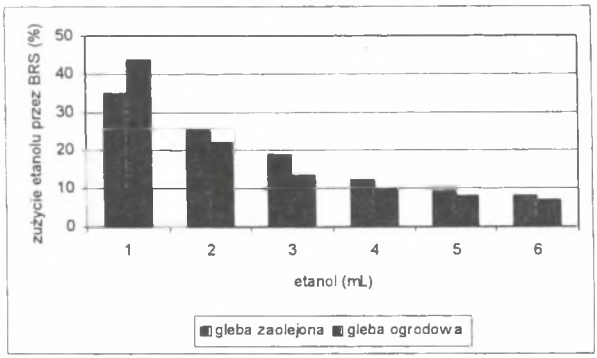


Rys. 4. Maksymalne stężenie H_2S uzyskane w hodowlach bakterii namnożonych z gleby zaolejonej z terenu Rafinerii Płock SA i gleby ogrodowej na podłożu Postgate'a z różnym stężeniem etanolu

Fig. 4. Maximal H_2S concentration achieved in cultures of bacteria grown from petroleum contaminated soil from the Płock Refinery and garden soil in Postgate medium with different concentrations of ethanol

W żadnej z badanych hodowli fosfogips nie uległ całkowitej biotransformacji, co nie wynikało z niedoboru etanolu. Procentowe zużycie etanolu wynosiło bowiem od około 44 do 7% i było tym mniejsze, im więcej etanolu było w podłożu na początku hodowli (rys. 5).

Bakterie redukujące siarczany konkurują o etanol z innymi fizjologicznymi grupami bakterii. W kulturach *Desulfobulbus propionicus* (BRS) i *Paleobacter propionicus* (gatunek fermentacyjny) z etanolem jako jedynym źródłem węgla (5 mM) i Na_2SO_4 (5 mM) bakterie redukujące siarczany przegrywały konkurencję o ten substrat z bakteriami fermentującymi ze względu na wolniejszy wzrost. *D. propionicus* rósł bowiem z szybkością μ_{max}= 0,033 h^{-1}, podczas gdy *P. propionicus* z szybkością μ_{max}=0,054 h^{-1}. W konsekwencji badany gatunek BRS wykorzystywał w hodowlach stacjonarnych od 20 do 45% etanolu [12].



Rys. 5. Zużycie etanolu związane z procesem redukcji siarczanów wyrażone jako procent etanolu wprowadzonego do podłoża

Fig. 5. Utilization of ethanol related to sulfate reducing processes expressed as percentage of ethanol introduced into the medium

Znana jest także konkurencja BRS z bakteriami metanogennymi. W podłożach z etanolem konkurencyjnie wykorzystywany jest raczej nie etanol, ale octan. Zdecydowana większość BRS utlenia etanol tylko do octanu. Jednak niektóre gatunki, np. *Desulfotomaculum acetooxidans*, które utleniają etanol do CO_2, mogą także utleniać octan i na tym poziomie konkurują z bakteriami metanogennymi. Wg Oude Elferink i wsp. [7] o tym, jaka część ChZT będzie degradowana drogą redukcji siarczanów, decyduje stosunek ChZT/SO_4 (g/g). Teoretycznie całe ChZT może być degradowane przez BRS, jeżeli ten stosunek jest mniejszy od 0,66. Stosunek ChZT/SO_4 w opisywanych hodowlach wzrastał od 0,4 do 2,6. Wydaje się więc, że w większości badanych hodowli BRS konkurowały o etanol z bakteriami fermentacyjnymi, a o octan z bakteriami metanogennymi.

LITERATURA

1. Brock T. D., Madigan M. T.: *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall International, Inc. chapter 16, 562-608, 1991.
2. Friedrich M., Schink B.: *Isolation and characterization of desulforubidin-containing sulfate-reducing bacterium growing with glycolate*. Arch.Microbiol. 164, 271-279, 1995.
3. Gibson G.: *Physiology and ecology of the sulfate-reducing bacteria*. Journal of Applied Bacteriology 69, 769-797, 1990.
4. Kowalski W., Parafiniuk J., Stępisiewicz M.: *Mineralogia i geochemia fosfogipsów z hałdy Zakładów Chemicznych "Wizów"*. Archiwum Mineralogiczne 45, 115-134, 1990.
5. Kremer D. R., Nienhuis-Kuiper H. E., Hansen T. A.: *Ethanol dissimilation in Desulfovibrio*. Archives of Microbiology 150, 552-557, 1988.
6. Laanbroek H. J., Geerligs H. J., Sijsma L., Veldkamp H.: *Competition for sulfate and ethanol among Desulfobacter, Desulfobulbus, and Desulfovibrio species isolated from intertidal sediments*. Appl. Environm. Microbiol. 47, 329-334, 1984.
7. Oude Elferink S. J. W. H., Vorstman W. J. C., Sopjes A., Stams A. J. M.: *Desulforhabdus amnigenus gen.sp.nov., a sulfate reducers isolated from anaerobic granular sludge*. Arch. Microbiol. 164, 119-124, 1995.

8. Postgate J. R.: *The sulfate-reducing bacteria*. Second edition. Cambridge University Press, 1984.
9. Przytocka-Jusiak M., Kowalski W., Rzeczycka M., Błaszczyk M., Mycielski R.: *Produkty mikrobiologicznej transformacji fosfogipsów w beztlenowych hodowlach bakterii termofilnych*. Biotechnologia 29, 102-112, 1995.
10. Reichenbecher W., Schink B.: *Desulfovibrio inopinatus, sp. nov., a new sulfate-reducing bacterium that degrades hydroxyhydroquinone (1,2,4-trichydroxybenzene)*. Arch. Microbiol. 168, 338-344, 1997.
11. De Smul A., Dries J., Goethals L., Grotaerd H., Verstreate W.: *High rates of microbial sulphate reduction in a mesophilic ethanol – fed expanded-granular-sludge-blanket reactor*. Apll. Microbiol. Biotechnol. 48, 297-303, 1997.
12. Szewzyk R., Pfennig N.: *Competition for ethanol between sulfate-reducing and fermenting bacteria*. Arch. Microbiol. 153, 470-477, 1990.

Abstract

A search was made for sulphate reducing bacteria (SRB) capable of carrying out the biotransformation of phosphogypsum in media with ethanol. The studies embraced four environments; two natural ones (garden soil and sludge from the Vistula river) and two contaminated with crude oil-derived products (industrial wastes and fuel). The presence of sulphate reducing bacteria capable of the biotransformation of phosphogypsum (electron acceptor) in medium with ethanol (electron donor) was determined in all the studied environments. The production of H_2S in the bacterial cultures derived from the contaminated environments was higher than in those from natural environments. In further passages in Postgate medium with ethanol and phosphogypsum the activity of the SRB increased. The activity of SRB in minimal medium with ethanol and phosphogypsum was visibly lower than in the same medium with lactate and decreased with consecutive passages. The amount of phosphogypsum that was subject to biotransformation was similar in the cultures containing from 35 to 100 mM ethanol. The utilisation of ethanol directly related to the biotransformation of phosphogypsum was from 7 to 44% of the amount of ethanol introduced into the medium and decreased with increased concentration. The maximal activity of SRB was determined in cultures of microflora derived from soil contaminated with liquid fuel in Postgate medium with ethanol (approx. 50 mM). The activity was expressed by biotransformation of phosphogypsum at the rate of approx. 0.35 g/L/day.

Badania zostały wykonane w ramach prac finansowanych przez KBN (grant 9T 12B 005 15).

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Korneliusz Miksch