

Katarzyna Piekarska

Biosorpcja fluorantenu przez osad czynny

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) są związkami szeroko rozpowszechnionymi w środowisku naturalnym, gdyż pochodzą z procesów spalania substancji organicznych, w tym paliw stałych i płynnych [1]. Większość węglowodórów stanowi zanieczyszczenie trwałe, trudno podlegające procesom biodegradacyjnym, a jednocześnie wykazujące działanie szkodliwe i toksyczne zarówno dla roślin jak i zwierząt. Ponadto wiele z nich stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. WWA działają nie tylko toksycznie ale również mutagennie, rakotwórczo i teratogennie [2]. Do wywołania procesów nowotworowych wystarczają już mikrośladowe ilości WWA. Najsilniejsze działanie mutagenne i rakotwórcze wykazują związki zawierające od 3 do 6 pierścieni benzenowych w cząsteczce, np. benzo(a)piren czy chryzen [3].

Węglowodory aromatyczne mogą być usuwane z ekosystemów drogą fotooksydacji, oksydacji chemicznej bądź biodegradacji [4]. Jednocześnie wiadomo, że tylko bardzo niewielka ilość mikroorganizmów ma zdolność do rozkładu WWA, oraz że szybkość ich biodegradacji maleje wraz ze wzrostem liczby pierścieni benzenowych w cząsteczce. Czas potrzebny na degradację mikrobiologiczną połowy ilości WWA obecnych w środowisku naturalnym waha się w szerokich granicach, w zależności od wielu czynników, i wynosi średnio od kilku dni do około roku [3]. Ze względu na częste zanieczyszczenie wody i ścieków wielopierścieniowymi węglowodarami aromatycznymi, ich małą rozpuszczalność w wodzie, która powoduje gromadzenie się WWA w ilościach wielokrotnie przekraczających ich naturalną rozpuszczalność, oraz ze względu na ich wysoką szkodliwość dla żywych organizmów, w tym również dla człowieka, a także trudności w ich biodegradacji, powstaje potrzeba poszukiwania nowych możliwości szybkiej eliminacji tych związków z wody i ścieków.

Celem niniejszej pracy było wykazanie, na przykładzie fluorantenu, czy proces biosorpcji WWA przez osad czynny mógłby być pomocny w szybkiej eliminacji poliaromatycznych węglowodórów z wody i ścieków. Jakkolwiek sam fluoranten nie jest zaliczany do związków kancerogennych, to jednak znane są przykłady, w których podczas jego metabolicznych przemian powstają produkty posiadające takie cechy [5].

Materiał i metody

Hodowlę osadu czynnego prowadzono przez około dwa tygodnie. Codziennie do komory napowietrzania dodawano ścieki syntetyczne o składzie symulującym ścieki bytowo gospodarcze [6]. W trakcie hodowli osadu czynnego badano następujące jego parametry: obraz makroskopowy [7], odczyn ścieków odpływających, zawartość tlenu w komorze napowietrzania, indeks objętościowy

[8], aktywność dehydrogenazową [9] i obraz mikroskopowy [10]. Po wyhodowaniu odpowiedniej ilości osadu czynnego przystąpiono do właściwego eksperymentu. W tym celu biomasę osadu czynnego oddzielono od płynu pochodzającego metodą wirowania (5 tys. obr./min przez 10 min). Następnie osad trzykrotnie przemywano buforem fosforanowym o pH=7,0. Tak przygotowany osad czynny używano do badań procesu biosorpcji fluorantenu.

Proces ten prowadzono w naczynkach respirometrycznych aparatu Warburga. Do badań stosowano zawiesinę osadu czynnego w takich ilościach, aby po dodaniu jej do naczynek otrzymać następujące stężenia: 1.000 oraz 3.000 i 6.000 gsm/m³. W pierwszej serii badań do naczynek reakcyjnych wprowadzano acetonowy roztwór fluorantenu w takiej ilości, aby jego stężenie w naczynku wynosiło 1 g/m³. W drugiej serii badań, oprócz roztworu fluorantenu w tym samym stężeniu, wprowadzano do naczynek respirometrycznych roztwór glukozy w takiej ilości, aby jego stężenie w naczynkach wynosiło 1 %. Kontrolę przebiegu procesu chemooksydacji węglowodoru prowadzono w naczynku zawierającym fluoranten w stężeniu 1 g/m³ bez dodatku osadu czynnego. Wszystkie badania przeprowadzono bez dostępu światła, w temperaturze 20 °C, z wytrząsaniem, w czasie sześciu godzin.

W celu oznaczenia ubytku fluorantenu próby pochodzące z poszczególnych respirometrów odwirowywano, a płyn nadosadowy poddawano trzykrotnej ekstrakcji cykloheksanem stosując każdorazowo 100 cm³ rozpuszczalnika na 1 dm³ płynu pochodzającego [11]. Równoległe wykonano trzy ekstrakcje cykloheksanem wodnych roztworów fluorantenu zawierających takie same stężenia tego węglowodoru jak w próbach badanych. Na tej podstawie określano wydajność procesu ekstrakcji. Następnie uzyskane cykloheksanowe ekstrakty, po uprzednim ich odwodnieniu bezwodnym siarczanem sodu, zagęszczano do sucha na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczano w 10 cm³ metanolu i poddawano analizie jakościowej i ilościowej metodą spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie. W trakcie kontaktu osadu czynnego z fluorantem w aparacie Warburga określano także zużycie tlenu przez osad czynny [12].

Aby określić wpływ badanego węglowodoru na funkcje fizjologiczne komórek mikroflory osadu czynnego, przygotowano również próby kontrolne zawierające osad czynny z dodatkiem glukozy oraz próby endogenne składające się jedynie z drobnoustrojów osadu czynnego zawieszonych w buforze fosforanowym. Zbadano także aktywność oddechową mikroflory osadu czynnego w obecności innych stężeń fluorantenu. W tej części doświadczenia stężenia fluorantenu w naczynkach respirometrycznych aparatu Warburga wynosiły 1 oraz 2 i 3 g/m³.

Wyniki badań

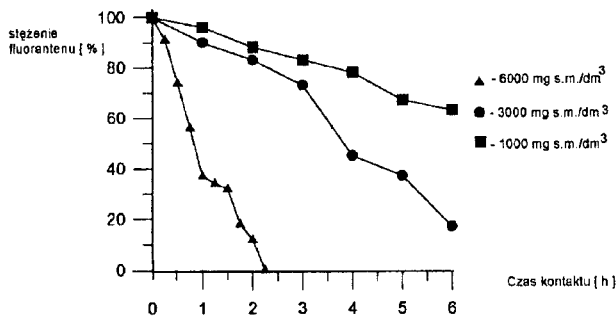
Parametry fizyczne i biologiczne osadu czynnego użytego do badań procesu biosorpcji fluorantenu były następujące:

- barwa szaro-brązowa,
- luźna struktura kłaczków,
- zawartość tlenu w cieczy nadosadowej $2,8 \pm 3,2 \text{ gO}_2/\text{m}^3$,
- pH cieczy nadosadowej $7,0 \pm 8,0$,
- indeks objętościowy $50,8 \pm 69,5 \text{ g/m}^3$,
- aktywność dehydrogenazowa $15 \cdot 10^{-3} \text{ gTF/gsm}$.

Ponadto stwierdzono występujące dość licznie skupiska bakterii zooglealnych, liczne orzęski wolno pływające (*Aspidisca costata*, *Paramecium sp.*, *Oxytricha sp.*), dość liczne orzęski osiadłe (*Vorticella sp.*, *Opercularia sp.*), sporadycznie występujące wiciowce (*Flagellata*) i korzenionózki (*Arcella*), a także występujące licznie wrotki (*Monostyla sp.*, *Rotaria rotatoria*).

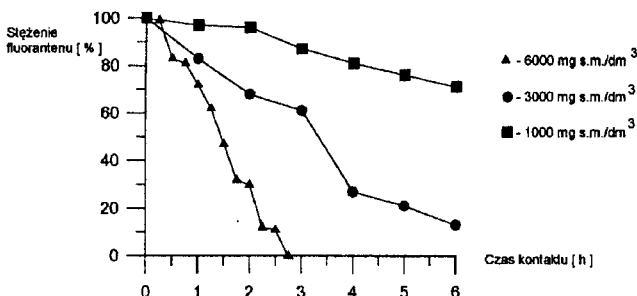
Obrazy widmowe ekstraktów, wykonane przy pomocy spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie, charakteryzowały się obecnością dwóch charakterystycznych dla fluorantenu pasm absorpcyjnych, występujących przy długościach fal 235 nm i 288 nm [13]. W żadnym ekstrakcie pochodzonym nie stwierdzono obecności metabolitów fluorantenu.

Zmiany stężenia fluorantenu w naczynkach respirometrycznych ilustrują rysunki 1 i 2.

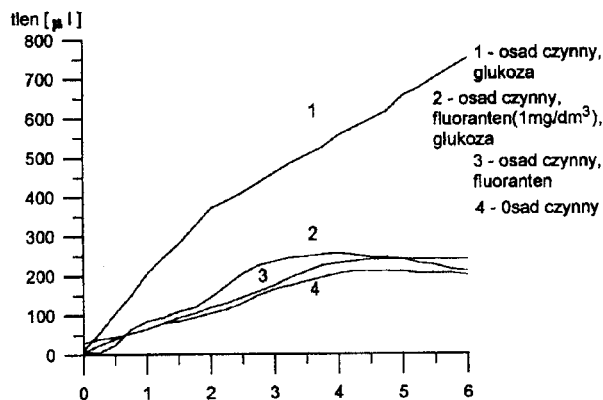


Rys. 1. Zmiany stężenia fluorantenu w funkcji czasu kontaktu przy różnych stężeniach osadu czynnego

W pierwszej serii badań (rys. 1) w naczynkach obecny był osad czynny z dodatkiem fluorantenu. Najszybszy i największy spadek stężenia analizowanego węglowodoru zaobserwowano w naczynkach zawierających największe stężenie osadu czynnego ($6.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$). W tym przypadku nie wykryto obecności fluorantenu już po 135 minutach trwania doświadczenia. W naczynkach, w których stężenie osadu czynnego wynosiło $3.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$ zaobserwowano po sześciu godzinach badań spadek stężenia węglowodoru o około 83 %, a w naczynkach zawierających osad czynny w ilości $1.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$ o około 36 %.

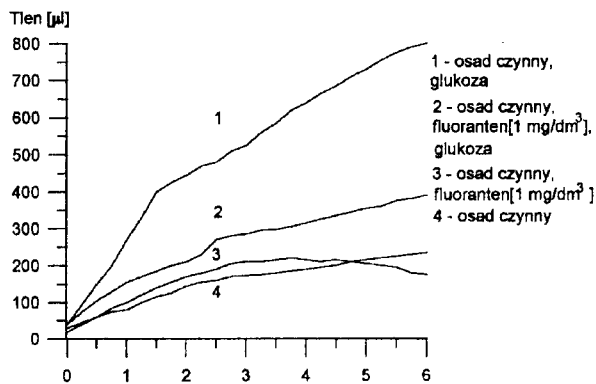


Rys. 2. Zmiany stężenia fluorantenu w funkcji czasu kontaktu przy różnych stężeniach osadu czynnego w obecności glukozy



Rys. 3. Intensywność oddychania osadu czynnego ($1.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$) w funkcji czasu

W drugiej serii badań (rys. 2) w naczynkach obecny był osad czynny z dodatkiem fluorantenu i glukozy. W przypadku, gdy stężenie osadu czynnego wynosiło $6.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$ stu procentowy ubytek węglowodoru zaobserwowano po 165 minutach trwania doświadczenia, natomiast gdy naczynka respirometryczne zawierały osad w stężeniu $3.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$ po sześciu godzinach kontaktu zaobserwowano 87-procentowy spadek stężenia fluorantenu. Po tym samym czasie ubytek węglowodoru w naczynkach z osadem czynnym o stężeniu $1.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$ wynosił około 28 %.

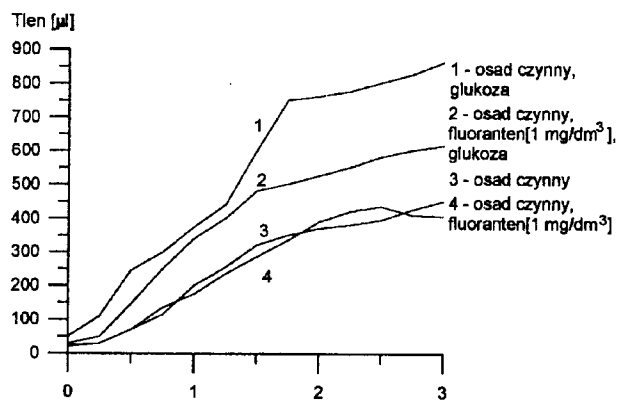


Rys. 4. Intensywność oddychania osadu czynnego ($3.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$) w funkcji czasu

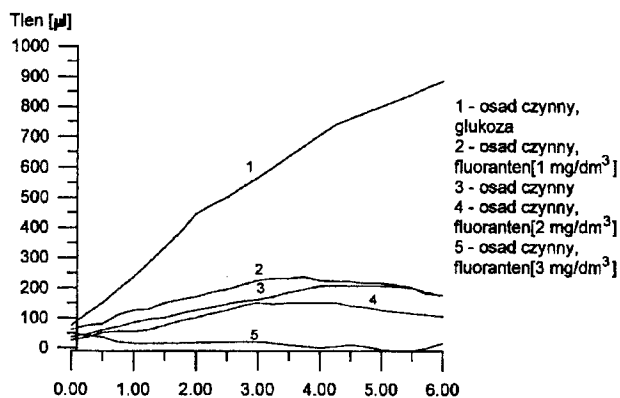
Badania ekstraktu pochodzącego z naczynka kontrolnego przy pomocy spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie nie wykazały ubytku fluorantenu w wyniku chemooksydacji w ciągu sześciu godzin trwania doświadczenia. Wydajność procesu ekstrakcji wahała się w granicach 59,5–83,5 %. Wyniki badań dotyczące oceny przebiegu procesów dysymilacji i podatności fluorantenu na biologiczne utlenianie osadem czynnym określane metodą manometryczną ilustrują rysunki 3–7.

Osad czynny, z dodatkiem glukozy jako jedyne źródła węgla, charakteryzował się bardzo dobrą aktywnością oddechową. Aktywność oddechowa mikroflory osadu w obecności fluorantenu i glukozy była również dość wysoka, zwłaszcza w przypadku, gdy stężenie osadu w naczynku wynosiło $6.000 \text{ gsm}/\text{m}^3$ (rys. 5). Wprowadzenie do osadu czynnego jedynie fluorantenu spowodowało wyraźny spadek aktywności oddechowej mikroflory. W przypadku, gdy stężenie fluorantenu wynosiło $1 \text{ g}/\text{m}^3$, wartości oddychania oscylowały wokół aktywności oddychania endogennego. Pozwala to na przypuszczenie, że badany węglowodór nie był wykorzysty-

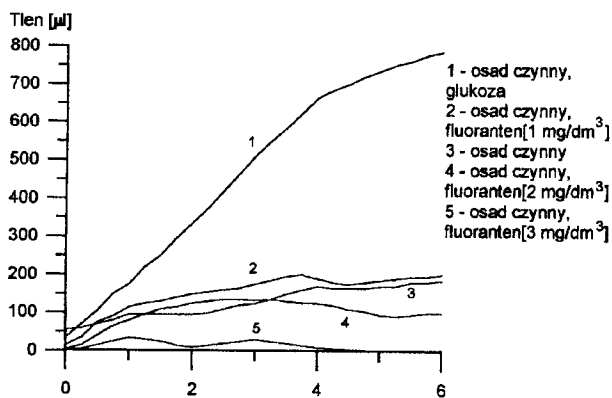
wany jako źródło energii i węgla, lecz organizmy osadu czynnego korzystały z własnych wewnątrzkomórkowych substratów. Gdy stężenie fluorantenu w naczynkach respirometrycznych wynosiło 2 i 3 g/m³, wówczas intensywność oddychania mikroflory osadu czynnego spadała poniżej wartości oddychania endogennego (rys.6,7). Znaczne zakłócenia w procesie oddychania zaobserwowano także w przypadku, gdy fluoranten występował w stężeniu 3 g/m³. Świadczy to o toksycznym oddziaływaniu wyższych stężeń fluorantenu na mikroflorę osadu czynnego.



Rys.5. Intensywność oddychania osadu czynnego (6.000 gsm/m³) w funkcji czasu



Rys.6. Intensywność oddychania osadu czynnego (1.000 gsm/m³) w funkcji czasu w obecności różnych stężeń fluorantenu



Rys.7. Intensywność oddychania osadu czynnego (3.000 gsm/m³) w funkcji czasu w obecności różnych stężeń fluorantenu

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały wyraźny spadek stężenia fluorantenu (28±100 %) podczas jego kontaktu z biomasą osadu czynnego, uzależniony od ilości biomasy i czasu kontaktu. Dodatek glukozy do naczynkach zawierających osad czynny i fluoranten nie miał istotnego wpływu na spadek stężenia fluorantenu. Jednocześnie w ekstraktach pochodzących stwierdzono brak obecności metabolitów fluorantenu, powstałych w wyniku działalności życiowej mikroorganizmów. Brak metabolitów węglowodoru obserwowano zarówno w próbach, w których był obecny jedynie fluoranten jak i w próbach, w których była obecna również glukoza. Ponadto intensywność dysymilacji mikroflory osadu czynnego w warunkach, gdy stężenie fluorantenu wynosiło 1 g/m³ była zbliżona do intensywności dysymilacji endogennej. Wyższe stężenia tego węglowodoru, 2 i 3 g/m³, oddziaływały toksycznie na organizmy osadu czynnego, ponieważ ilość pobranego tlenu przez mikroflorę osadu spadała poniżej ilości tlenu pobranego wskutek oddychania endogennego.

Uzyskane wyniki badań pozwalają na przypuszczenie, że zjawisko biosorpcji fluorantenu przez osad czynny może mieć istotne znaczenie praktyczne, np. dla szybkiej eliminacji poliaromatycznych węglowodorów ze ścieków.

LITERATURA

1. T. DUTKIEWICZ i inni: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne w środowisku przyrodniczym. Instytut Kształtowania Środowiska, PWN, Warszawa 1988.
2. B. MALCZEWSKA i inni: Substancje rakotwórcze w środowisku pracy, tom II: Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Instytut Medycyny Pracy w Łodzi, Łódź 1987.
3. B. MALISZEWSKA-KORDYBACH: Mikrobiologiczne przemiany wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku glebowym. Postępy mikrobiologii, 1987, tom XXVI, zeszyt 3.
4. S. ŁABUŹEK: Biodegradacja struktury aromatycznej fenoli przez drobnoustroje. Biotechnologia, 1991, nr 3-4(13-14).
5. E.J. La VOIE et al.: Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites benzo(g)fluorentene and benzo(k)fluoranthene. Can. Res., 1980, No. 40, pp. 4528-4532.
6. A. ZAJĄCZKOWSKA-STEMPŁOWSKA: Wpływ wybranych związków toksycznych miedzi, niklu, kadmu na przebieg procesów oczyszczania ścieków za pomocą osadu czynnego w warunkach konwencjonalnych. Praca doktorska, Politechnika Warszawska, Warszawa 1969.
7. M. HUL: Biologiczne kryteria oceny osadu czynnego. Człowiek i Środowisko, 1986, nr 10(2), ss. 227-250.
8. W. HERMANOWICZ i inni: Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków. Arkady, Warszawa 1976.
9. A. KLAPWIJK, J. DRENT, J.H.A. STEENVORDEN: A modified procedure for the TTC-dehydrogenase test in activated sludge. Water Res., 1974, No. 8, pp. 121-125.
10. H. KLIMOWICZ: Znaczenie mikrofauny przy oczyszczaniu ścieków osadem czynnym. Instytut Kształtowania Środowiska, Warszawa 1983.
11. H. ZAWADZKA, J. ZERBE, D. BARAŁKIEWICZ: Wydzielanie, rozdzielanie i oznaczanie PWA w wodach naturalnych. Chemia Analityczna, 1980, nr 25, s. 407.
12. W. BRZESKI, Z. KANIUGA: Praktikum z biochemii. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 1968.
13. M.L. LEE, M.V. NOVOTNY, K.D. BARTLE: Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds. Academic Press, New York 1981.

BIOSORPTION OF FLUORANTHENE BY ACTIVATED SLUDGE

Biosorption of fluoranthene by activated sludge was examined in a laboratory-scale study. Variations in fluoranthene concentration were related to biomass concentration and contact time. Making use of the Warburg manometric method, the effect of the hydrocarbon on the physiological function of the microorganisms present in the activated sludge was established. Thus, the decrease of fluoranthene concentration was found to range from 28 to

100%, according to the concentration of the biomass and the time of contact. The extracts from individual samples contained no fluoranthene metabolites. Respiratory activity measurements showed that the microorganisms failed to utilize fluoranthene as a carbon and energy source, and that increased fluoranthene concentrations had a toxic effect on them. Summing up, the decrease of fluoranthene concentration with contact time was of a biosorptive nature.