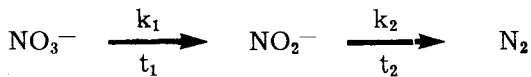


Anna Juszcak
Florian Domka

WPLYW TEMPERATURY I pH NA PARAMETRY KINETYCZNE PROCESU BIODENITRYFIKACJI

Obecność azotu azotanowego w wodach ujmowanych do celów wodociagowych jest niewskazana, głównie ze względów zdrowotnych. Ponieważ konwencjonalne metody oczyszczania wód i ścieków nie pozwalają na skuteczne unieszkodliwianie azotanów, dlatego interesującą jest rozważenie możliwości wykorzystania w tym celu metody biochemicznej denitryfikacji. W pracach nad kinetycznym modelem procesu biodenitryfikacji wykazano, że proces ten, realizowany przez wyizolowaną kulturę bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, przebiega zgodnie z kinetycznym modelem układu nieodwracalnych reakcji następczych I-go rzędu z trwałym produktem pośrednim, według następującego schematu:



Dla modelu tego wyprowadzono równania kinetyczne obydwu etapów reakcji, umożliwiające obliczenie stałych szybkości (k_1 , k_2) oraz okresów indukcyjnych (t_1 , t_2) [1, 2].

W niniejszej pracy przebadano wpływ temperatury i pH środowiska na przebieg procesu biodenitryfikacji, który ze względu na udział bakterii jest wrażliwy na zmiany tych parametrów. Na ogół prędkość przemian tego typu rośnie wraz ze wzrostem temperatury lub ze zmianą pH do pewnej wartości optymalnej, powyżej której gwałtownie spada. Wzrost temperatury przyspiesza dwa niezależne procesy, a mianowicie katalizowaną reakcję i inaktywację enzymu. Współczynnik temperaturowy (przy wzroście temperatury o 10°C) dla reakcji enzymatycznych biegnących poniżej temperatury optymalnej przybiera wartości leżące w przedziale 1÷2, a powyżej tej temperatury maleje wskutek termicznej inaktywacji enzymu. Równanie Arrheniusa opisujące zależność temperaturową stałych szybkości reakcji, choć często wykorzystywane do opisu całkowitego procesu fizjologicznego, nie ma zastosowania do indywidualnych reakcji enzymatycznych.

Doniesienia literaturowe dotyczące wpływu temperatury na przebieg procesu denitryfikacji różnią się między sobą [3, 11]. Najczęściej podawany jest dość szeroki przedział aktywności denitryfikatorów, mieszczący się między 4 a 70°C, przy czym zależy on od gatunku drobno-

ustrojów oraz warunków fizykochemicznych środowiska [6, 7, 10, 11]. Przeważają wszakże badania, z których wynika, że denitryfikacja przebiega najefektywniej w zakresie temperatur od 15 do 35°C [3—9]. Znana jest instalacja, pozwalająca na całkowite usuwanie azotanów ze ścieków z największą wydajnością w przedziale temperatur od 23 do 31°C [9]. Warto również zwrócić uwagę na fakt, że temperatura układu wywiera także wpływ na produkty denitryfikacji. W temperaturach niskich i powyżej 70°C głównym produktem procesu jest N_2O , podczas gdy w pozostałych przypadkach otrzymuje się azot cząsteczkowy [1, 2].

Drugim parametrem, który w znacznym stopniu decyduje o aktywności procesu denitryfikacji, jest wartość pH układu. Jak wiadomo, enzymy, w tym także enzymy bakterii biorących udział w denitryfikacji, wykazują aktywność w odpowiednim zakresie pH. Występowanie wyraźnego maksimum aktywności enzymu w funkcji pH spowodowane jest jego nieodwracalną inaktywacją albo malejącym powinowactwem enzymu do substratu po jednej lub obu stronach optymalnej wartości pH. Każdy enzym reaguje na zmiany pH układu w charakterystyczny dla siebie sposób, zgodny ze swoim składem aminokwasowym.

Wpływ pH na aktywność enzymów zaangażowanych w procesie denitryfikacji nie został jeszcze w pełni opisany. Badania ograniczają się do określenia optymalnego zakresu pH, nie wnioskując w mechanizm reakcji, a wyniki wykazują duże rozbieżności. Panuje natomiast zgodność co do tego, że pH, podobnie jak temperatura, decyduje o produktach denitryfikacji, przy czym przy niskich wartościach pH (ok. 5) podstawowym produktem jest N_2O , natomiast przy $\text{pH} \approx 6$ jest nim N_2 [1]. Ponieważ jedyną miarodajną metodą określania wpływu temperatury i pH na przebieg reakcji enzymatycznych jest wyznaczenie stałych szybkości lub stałych równowagi reakcji w funkcji tych parametrów, w pracy tej zamieszczono wyniki badań nad wpływem temperatury i pH środowiska na parametry kinetyczne procesu denitryfikacji.

Metodyka badań

Bakterie *Pseudomonas* wyizolowano z gleb ogrodowych, przenosząc je na pożywki azotanowe o składzie [1, 2]: mleczan sodu — 5, Na_2HPO_4 — 1, CaCl_2 — 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5,

NH_4Cl — 0,25, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ — 0,25, KNO_3 — 10; mikroelementy: $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ — $1,5 \cdot 10^{-4}$, Na_2SeO_3 — $1 \cdot 10^{-5}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — $1,2 \cdot 10^{-2}$, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ — $2 \cdot 10^{-3}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — $1 \cdot 10^{-3}$, H_3BO_3 — $8,6 \cdot 10^{-3}$, MnSO_4 — $3,1 \cdot 10^{-2}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — $3 \cdot 10^{-3}$ (wszystkie wartości podano w g/dm^3).

Proces wzrostu bakterii oraz badania kinetyczne prowadzono w warunkach beztlenowych (argon). Do badań kinetycznych stosowano pożywki, w których stężenie azotu azotanowego wynosiło $1,4 \text{ g N/dm}^3$, a jedynym substratem organicznym był mleczan sodu o stężeniu zapewniającym stosunek masowy węgla organicznego do azotu nieorganicznego (C/N) równy $1,4 \text{ g/g}$.

Stężenia azotanów i azotynów oznaczano spektrofotometrycznie (Specol-Carl Zeiss Jena) [14]. Stężenia gazowych produktów reakcji określano chromatograficznie, wykorzystując Chromatron GCHF 18.3 (NRD) z kolumnami ze stali nierdzewnej o długości 1 m, średnicy wewnętrznej 0,4 mm, wypełnionymi sitami molekularnymi 13X i poropakiem, w temperaturze pokojowej, stosując jako gaz nośny hel o przepływie $2 \text{ dm}^3/\text{h}$.

Statystyczną ocenę wyników oraz obliczenia kinetyczne wykonano na mikrokomputerze „Acorn B”, a wykresy sporządzono przy pomocy drukarki IBM [1]. Szczegóły związane z izolacją i identyfikacją denitryfikatorów oraz z badaniami kinetycznymi zamieszczono w poprzednich pracach [1, 2].

Interpretacja wyników

Wyizolowaną hodowlę bakterii inkubowano w siedmiu temperaturach w przedziale od 14 do 44°C (co ok. 5°C). W przypadku zastosowania krańcowych temperatur badanego przedziału (14 i 44°C) nie obserwowano wzrostu mikroorganizmów, ani też redukcji azotanów. Dla pozostałych temperatur, w których denitryfikacja zachodziła, obliczono stałe szybkości (k_1 , k_2) i okresy indukcyjne (t_1 , t_2) obydwu etapów reakcji, a odpowiednie wyniki wraz z oszacowaniem statystycznym [1, 2] zamieszczono w tabeli 1.

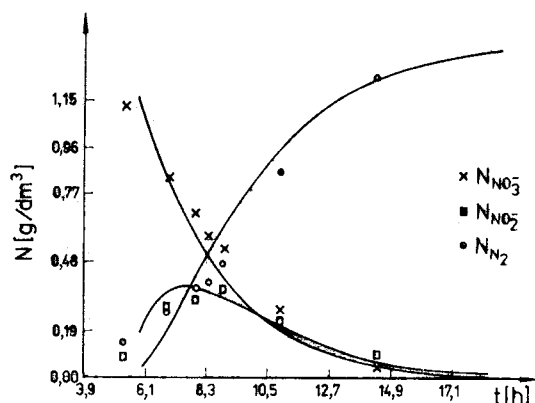
Tabela 1
PARAMETRY KINETYCZNE BIODENITRYFIKACJI I ICH OSZACOWANIE
STATYSTYCZNE DLA RÓŻNYCH TEMPERATUR INKUBACJI

temp. [$^\circ\text{C}$]	k_1 [h^{-1}]	t_1 [h]	k_2 [h^{-1}]	t_2 [h]	t_{max} [h]	NO_2^- max [g/dm^3]	S_u	r
19	0,288	20,7	0,154	23,0	27,7	0,35	0,022	0,96
26	0,288	12,6	0,200	15,0	19,2	0,31	0,014	0,91
31	0,294	12,0	0,200	13,4	17,5	0,41	0,025	0,98
37	0,336	5,4	0,564	5,4	7,7	0,39	0,200	0,96
41	0,274	6,0	0,151	7,2	12,0	0,49	0,020	0,98

$t_{\text{max}}(\text{NO}_2^-)$ — czas, po którym występuje maksymalne stężenie azotynów

S_u — średni statystyczny błąd metody wyznaczony dla II etapu redukcji,

r — współczynnik korelacji dla I etapu redukcji.

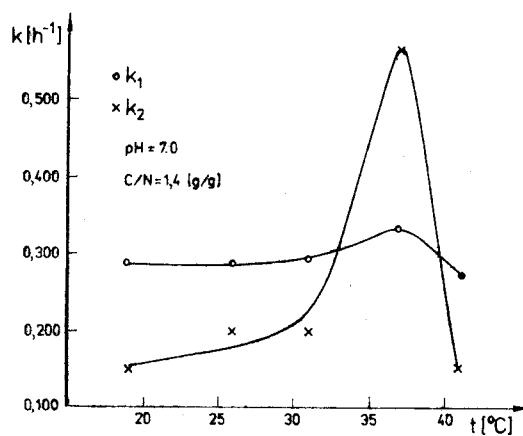


Rys. 1. Zmiany stężeń azotanów, azotynów i azotu w zależności od czasu trwania procesu denitryfikacji (linia ciągła — krzywe teoretyczne, punkty — dane eksperymentalne)

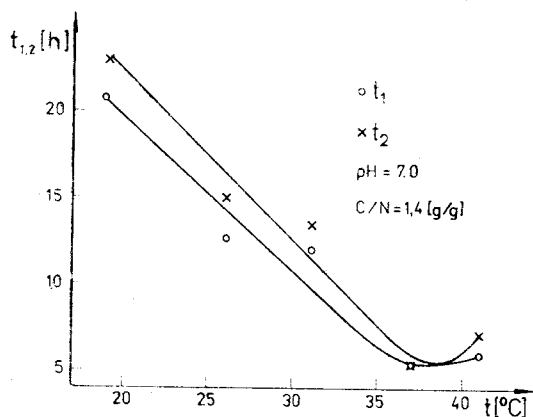
Ponadto na podstawie obliczonych parametrów kinetycznych, dla każdej z badanych temperatur, wykreślono krzywe teoretyczne zmian stężenia występujących form azotu nieorganicznego w funkcji czasu trwania reakcji i skorelowano je z danymi eksperymentalnymi. Dla ilustracji tego cyklu badań zamieszczono przykładowo jeden z typowych wykresów, wykonany dla optymalnej temperatury 37°C (rys. 1).

Z przeprowadzonych korelacji wynika, że największe rozbieżności między krzywymi teoretycznymi i eksperymentalnymi występują w zakresie wysokich stężeń azotanów. Obserwuje się również przesunięcie maksimum krzywej teoretycznej stężenia azotynów ($\text{NO}_2^-_{\text{max}}$) w stronę czasów krótszych i nieznaczne jego obniżenie w stosunku do wartości eksperymentalnych. Odstępstwa te spowodowane są prawdopodobnie istnieniem okresów indukcyjnych w obydwu etapach reakcji, wynikających z początkowej wolnej fazy wzrostu mikroorganizmów [1].

W celu przeanalizowania wpływu temperatury na stałe szybkości reakcji i okresy indukcyjne procesu denitryfikacji wykreślono odpowiednie krzywe i przedstawiono je na rysunkach 2 i 3.



Rys. 2. Zależność statycznych szybkości reakcji od temperatury



Rys. 3. Zależność okresów indukcyjnych reakcji od temperatury

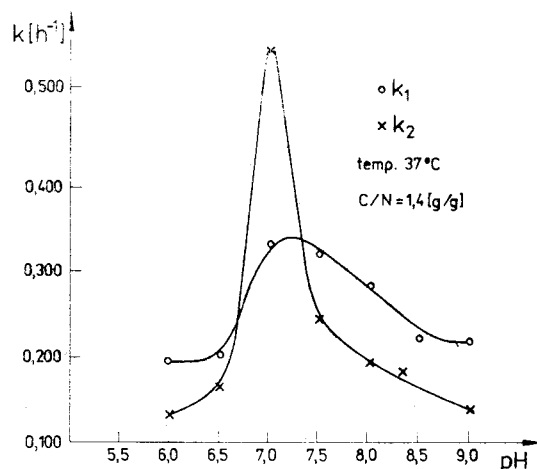
Krzywe ilustrujące zależność temperaturową stałych szybkości obydwu etapów redukcji miały charakter typowy dla reakcji enzymatycznych (rys. 2). Występuje zatem ściśle określony zakres temperatury, poza którym wartości obydwu stałych szybkości gwałtownie spadają. W obszarze tym istnieje maksimum pozwalające na wyznaczenie temperatury optymalnej, która w tym przypadku wynosiła 37°C. Warto przy tym zauważyć, że drugi etap redukcji reaguje gwałtowniej na zmiany temperatury niż pierwszy, co może być spowodowane różną naturą enzymów katalizujących poszczególne etapy. Obydwie stałe szybkości zmieniają się drastycznie w przypadku podwyższenia temperatury w stosunku do optymalnej, niż w przypadku jej obniżenia. Wystarczy zwrócić uwagę na fakt, że już 7-stopniowy jej przyrost (od 37 do 44°C) powoduje całkowitą inaktywację układu.

Spadek wartości okresów indukcyjnych reakcji wraz ze wzrostem temperatury inkubacji w zakresie do 37°C posiada w przybliżeniu charakter liniowy (rys. 3). Dopiero przy dalszym podwyższaniu temperatury następuje stopniowe, nieznaczne ich wydłużanie. Zatem temperaturę 37°C można przyjąć za optymalną dla procesu biodenitryfikacji, zarówno ze względu na największe wartości stałych szybkości, jak i na najkrótsze okresy indukcyjne.

Badania wpływu pH środowiska na szybkość procesu denitryfikacji prowadzono na pożywkach, w których pH stopniowo zwiększano o połowę jednostki w przedziale od 5,5 do 9,5. W skrajnych wartościach badanego zakresu,

Tabela 2
PARAMETRY KINETYCZNE BIODENITRYFIKACJI I ICH OSZACOWANIE
STATYSTYCZNE DLA RÓŻNYCH WARTOŚCI pH
(temp. 37°C, C/N=1,4)

pH	k_1 [h ⁻¹]	t_1 [h]	k_2 [h ⁻¹]	t_2 [h]	t_{max} [h]	NO_2^- [g/dm ³]	S_u	r
6,0	0,199	15,8	0,133	16,0	22,0	0,51	0,036	0,95
6,5	0,201	15,0	0,163	16,3	22,0	0,43	0,047	0,98
7,0	0,336	5,4	0,564	5,4	7,7	0,39	0,020	0,96
7,5	0,323	7,2	0,242	8,3	11,9	0,42	0,026	0,94
8,0	0,281	7,8	0,187	8,4	12,7	0,50	0,038	0,96
8,5	0,221	11,6	0,184	12,5	17,5	0,46	0,030	0,99
9,0	0,211	17,0	0,136	18,1	24,0	0,51	0,031	0,97

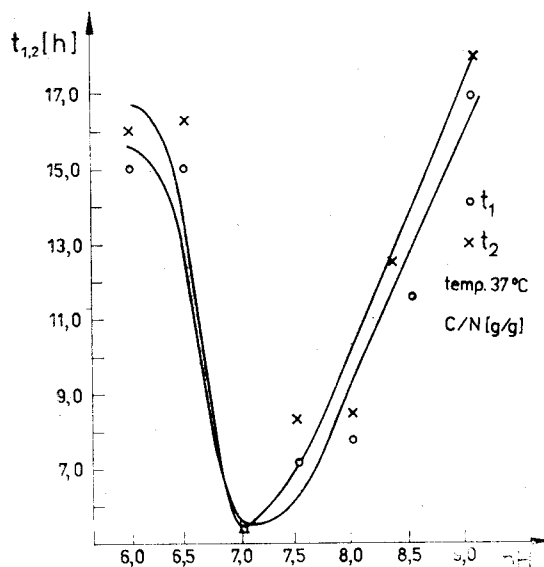


Rys. 4. Zależność stałych szybkości reakcji od pH środowiska

podobnie jak w przypadku temperatury, nie obserwowano wzrostu mikroorganizmów, a co za tym idzie, redukcji azotanów. Dla pozostałych wartości pH, przy których denitryfikacja zachodziła, obliczono parametry kinetyczne procesu (tab. 2).

W oparciu o obliczone parametry wykreślono również krzywe teoretyczne zmian stężenia poszczególnych form azotu w funkcji czasu oraz skorelowano je z danymi doświadczalnymi. Krzywe kinetyczne wykreślone dla poszczególnych temperatur i wartości pH badanych przedziałów świadczą o tym, że mechanizm denitryfikacji pozostaje nie zmieniony, a zmieniają się jedynie wartości parametrów kinetycznych [1]. Dodatkowo na rysunkach 4 i 5 przedstawiono wpływ pH pożywki na stałe szybkości i okresy indukcyjne reakcji.

Zależność stałych szybkości denitryfikacji od pH środowiska miała podobny przebieg jak odpowiednia zależność temperaturowa, przy czym maksimum dla obydwu etapów przypada



Rys. 5. Zależność okresów indukcyjnych reakcji od pH środowiska

dla $\text{pH}=7,0$. Ponadto z krzywych tych wynika, że wyizolowana kultura bakterii jest bardziej wrażliwa na środowisko kwasowe niż zasadowe, ponieważ obniżając pH w stosunku do optymalnego obserwuje się gwałtowniejszy spadek stałych szybkości niż w przypadku jego podwyższenia. Również drugi etap redukcji, podobnie jak dla funkcji temperaturowej, reaguje drastyczniej na zmiany pH niż pierwszy (rys. 4).

Krzywa zależności okresów indukcyjnych od pH posiada wyraźne minimum przypadające na pH obojętne (rys. 5). Jednakże przy przechodzeniu od środowiska kwasowego do alkalicznego obserwuje się najpierw liniowy spadek wartości okresów indukcyjnych do pH obojętnego, a dopiero potem łagodniejszy ich wzrost. Ze względu na największe wartości stałych szybkości reakcji i najkrótsze okresy indukcyjne optymalne pH badanego procesu wynosi 7,0.

Podsumowanie

Reasumując należy stwierdzić, że temperaturę 37°C oraz $\text{pH}=7$ można uznać za optymalne parametry procesu denitryfikacji realizowanego przez wyizolowaną kulturę denitryfikatorów z rodzaju *Pseudomonas*, i to zarówno ze względu na maksymalne wartości stałych szybkości, jak i najkrótsze okresy indukcyjne reakcji.

Jednocześnie należy stwierdzić, że do zastosowania procesu w rozwiązaniach technologicznych nadaje się zakres temperatur od 19 do 40°C , oraz przedział pH od 6,5 do 8,0 czyli cały obszar, w którym denitryfikatory pozostają aktywne. W tym przypadku wydłuża się jedynie okres indukcyjny i maleją stałe szybkości reakcji, ale unika się kosztownego ogrzewania lub schładzania dużych objętości ścieków.

W pracy wykazano, że bakterie z rodzaju *Pseudomonas* realizują proces denitryfikacji zgodnie z kinetycznym modelem układu nieodwrotnych reakcji następujących. Z badań także wynika, że obok warunków optymalnych, istnieje stosunkowo szeroki zakres temperatury i pH , przy którym bakterie z rodzaju *Pseudomonas* realizują efektywnie proces denitryfikacji. Stwarza to możliwość wykorzystania ich w warunkach przemysłowych do oczyszczania ścieków o stężeniu azotanów do $1,4 \text{ g N/dm}^3$.

LITERATURA

1. A. JUSZCZAK: Badania kinetyczne mikrobiologicznej redukcji azotanów. Rozprawa doktorska. Wydział Chemii UAM, Poznań, 1987.
2. A. JUSZCZAK, F. DOMKA: Chemia Stosowana. 1988, XXXII (2), p. 299—307.
3. E. BRODA: The Evolution of Bioenergetic Processes. Pergamon Press, 1975.
4. G. S. COOPER, K. L. SMITH: Soil Sci. Amer. Proc., 1963, 27, p. 659.
5. H. D. STENSEL, R. C. LOEHR, A. W. LAWRENCE: J.W.P.C., 1973, 45(2), p. 249.
6. J. M. BREMNER, K. SHAW: Agric. Sci., 1958, 51, p. 40.
7. F. PICHINOTY: Int. Jour. Systematic Bacteriol., 1977, 27(4), p. 346.
8. F. E. CLARK, J. N. NAPIER: Biological Treatment of Concentrated Nitrate Waste. Part Nr Y (DA-6967), 1977.
9. E. S. SEVAGE, J. J. CHEN: Operation Experiences with Columnar Denitryfication. Patent Nr 72 WWT 12.
10. G. STANFORD, R. A. VANDERPOL, S. DZIEŃNIA: Soil Sci. Soc. Am. Proc., 1975, 39, p. 234.
11. C. W. FRANCIS, C. D. MALONE: Prog. Wat. Tech., 1977, 8, Nr 4/5, p. 637.
12. H. NOMNIK: Acta Agric. Scand., 1956, VI. 2, p. 195.
13. Praca zbiorowa: Fizykochemiczne Metody Badania Wód i Ścieków. Warszawa 1976, s. 131.
14. Z. MARCZENKO: Kolorymetryczne oznaczanie pierwiastków. WNT, Warszawa 1968.

THE EFFECT OF TEMPERATURE AND pH ON THE KINETIC PARAMETERS OF THE BIODENITRIFICATION PROCESS

Using an isolated bacterial culture of the *Pseudomonas* genus, the optimum temperature (37°C) and pH (7.0) for the denitrification process are established. Determined are also the ranges of the two parameters in which the investigated denitrifying bacteria remain active. Making use of a kinetic model of the

process, the rate constants and the induction periods of the reaction are calculated. The values of the kinetic parameters enable determination of theoretical curves which relate the concentration variations for all forms of inorganic nitrogen to the duration of the reaction. The results have been correlated with empirical data. Determined are also the pH -dependence and the temperature-dependence of the rate constants and induction times.