

Ing. JAN PÁČA, CSc., Ing. MARTINA FABIÁNKOVÁ, Prof. Ing. Dr. VRATISLAV GRÉGR, DrSc., VŠCHT katedra kvasné chemie a technologie, Praha

Do redakce došlo 20. září 1976

1. Úvod

Výzkum využití uhelné hmoty jako zdroje uhlíku a energie pro růst mikroorganismů byl zahájen na počátku století. Nejprve byly konány pokusy přímého využití rozemletého uhlí přidávaného do živné půdy [1–4]. Přímé využití uhelné hmoty mikroorganismy je však omezeno nízkým obsahem přímo asimilovatelných látek, což jsou neprouhelné zbytky ligninu a celulózy. Pro mikrobiologické zpracování je proto výhodná předběžná úprava uhelné hmoty, kterou lze provést termicky, extrakcí nebo chemickými činidly.

Jednou z novějších metod získávání rozpustných organických látek je oxidace uhelné hmoty ve vodném prostředí [5]. Tento způsob přípravy byl použit i v této práci. V produktech oxidace byly prokázány fenoly a jejich homology, kyseliny furankarbonové, nafteny, vysokomolekulární alkoholy a ketony, dále kyselina mravenčí a řada aromatických a alicyklických uhlovodíků. Má-li se produktů oxidace využít jako substrátu pro kultivaci mikroorganismů, je nutno uvažovat i přítomnost látek obtížně asimilovatelných a toxických. Proto byla tato práce zaměřena na ověření schopnosti utilizace oxidačních produktů uhelné hmoty několika vybranými druhy bakterií.

2. Metodika

2.1 Tlaková oxidace uhelné hmoty ve vodném prostředí

K oxidaci byly zvoleny tři druhy palivově méně hodnotných uhelných hmot, a to lignit z Višňové, uhelné kaly a hnědé uhlí Kapucín. Podmínky oxidace: teplota 250 °C, tlak 11,8 MPa, oxidačním plynem byl vzduch o průtoku 25 l·min⁻¹, doba oxidace 8 min.

Z oxidačních produktů byla pro kultivace používána pouze kapalná fáze. Oxidaci prováděla katedra koksárenství a plynárenství VŠCHT Praha.

2.2 Použité mikroorganismy

K experimentům byly použity tyto mikroorganismy: *Enterobacter cloacae* CCM 2320, *Bacillus megaterium* CCM 391, *Bacillus cereus* CCM 868, *Paracoccus denitrificans* CCM-982, *Pseudomonas putida* CCM 2702, *Pseudomonas indologidans* CCM 283, a neidentifikovaná bakterie cylindrického tvaru, pohyblivá, morfologicky odpovídající koliformním bakteriím, izolovaná ze zažívacího traktu termita *Neotermes castaneus*.

2.3 Kultivační média

Kultivace probíhala po zaočkování ze šikmého agaru na médiu M-63. U kultur z čs. sbírky mikroorganismů bylo do inokulačního i kultivačního média přidáno 0,01 % kvasničného autolyzátu. U bakterie izolované z termita nebyl přidáván kvasničný autolyzát.

2.4 Aparatura

Kultivovalo se ve fermentoru [6] s pracovním objemem 1500 ml při konstantní teplotě 30 °C, pH 7,0 a rychlosti přenosu kyslíku 200 mmol·l⁻¹·h⁻¹.

2.5 Analytické metody

Buněčná sušina byla stanovována gravimetricky. Po odstředění po dobu 20 min při 6000 ot·min⁻¹ a dvojnásobným promytím se vzorek sušil 1 h při 70 °C a 2,5 h při 105 °C.

Volné těkavé kyseliny (TK) byly stanovovány přeháněním vodní parou v Parnasově-Wagnerově přístroji a výsledky vztaženy na kyselinu octovou [7].

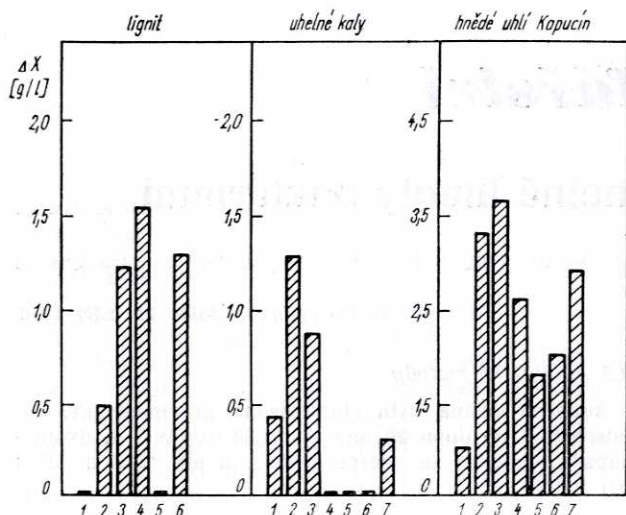
Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) byla stanovována dvojchromanem draselným [8].

3. Výsledky a diskuse

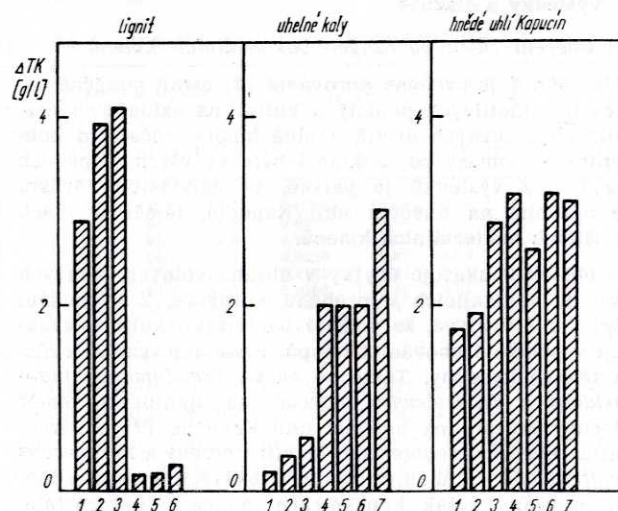
3.1 Ověření růstu vybraných bakteriálních kmenů

Na obr. 1 je uvedeno porovnání přírůstků buněčné sušiny u jednotlivých použitých kultur na oxidačních produktech z různých druhů uhelné hmoty. Počáteční koncentrace biomasy po inokulaci byla ve všech případech 2 g·l⁻¹. Z výsledků je patrné, že nejvyššího nárůstu se dosáhne na hnědém uhlí Kapucín, téměř u všech použitých bakteriálních kmenů.

Obrázek 2 ukazuje úbytky v obsahu volných těkavých kyselin, vznikajících v průběhu kultivace. Z porovnání obr. 1 a 2 vyplývá, že použité bakteriální kultury vykazují v podstatě chování tří typů. První typ využívá k růstu těkavé kyseliny. Takto se chová *Pseudomonas indologidans* a *Enterobacter cloacae* na lignitu a téměř všechny kultury na hnědém uhlí Kapucín. Při kultivaci kultur *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* a *Paracoccus denitrificans* na uhelných kalcích těkavých kyselin v médiu ubývalo, avšak koncentrace biomasy nevrůstala. Lze předpokládat, že tyto kultury těkavé kyseliny využívají, ale získanou energii nevyužívají k růstu (odpáření energetického metabolismu od růstu). Naopak kultury *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas indologidans* a *Enterobacter cloacae* na uhelných kalcích vykazovaly nárůst biomasy větší, než odpovídá úbytku těkavých kyselin, tzn. zřejmě využívaly k růstu kromě těkavých kyselin i jiných látek, obsažených v oxidačních produktech [9]. Ze srovnání s výsledky získanými na lignitu, kde se rozdíl v utilitaci a oxidaci projevil u jiných kmenů bakterií, lze předpokládat, že složení oxidačních produktů lignitu a uhelných kalů se pravděpodobně liší nejen kvantitativně, ale i kvalitativně. Proč se přednostně neutilizují těkavé kyseliny, které jsou relativně dobře asimilovatelné [10] nelze na základě provedených pokusů vysvětlit. Lze pouze předpokládat, že malý úbytek těkavých kyselin může být způsoben buď inhibicí jinými látkami obsaženými v oxidačních produktech uhelné hmoty, nebo pravděpodobněji inhibičním působením metabolických produktů či látek vzniklých biotransformací v průběhu kultivace. Tuto hypotézu podporuje zjištění, že u kultur vykazujících nárůst biomasy a malou spotřebu těkavých kyselin byl obsah rozpuštěných organických látek v médiu vyjádřený jako CHSK na konci kultivace vyšší než při startu, a to tím více, čím větší byl přírůstek biomasy.



Obr. 1. Přirůstky biomasy při kultivacích: 1 — *Pseudomonas putida*, 2 — *Pseudomonas indoloxidans*, 3 — *Enterobacter cloacae*, 4 — *Bacillus megaterium*, 5 — *Bacillus cereus*, 6 — *Paracoccus denitrificans*, 7 — směsná kultura

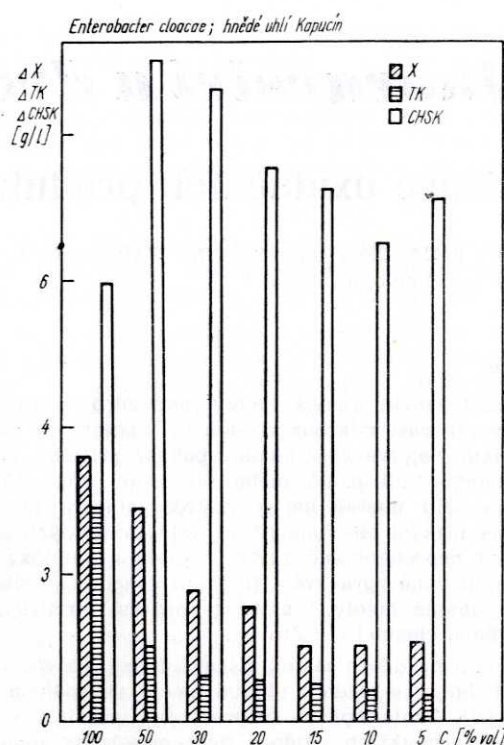


Obr. 2. Úbytek volných těkavých kyselin při kultivacích: 1 — *Pseudomonas putida*, 2 — *Pseudomonas indoloxidans*, 3 — *Enterobacter cloacae*, 4 — *Bacillus megaterium*, 5 — *Bacillus cereus*, 6 — *Paracoccus denitrificans*, 7 — směsná kultura

Směsná kultura vykazovala malý nárůst sušiny a současně vysoký úbytek těkavých kyselin. To je pravděpodobně způsobeno spotřebou utilizovaného substrátu nerostoucími mikroorganismy na úkor kultur rostoucích, dále pak vznikem metabolických produktů působících inhibičně na rostoucí kultury a kromě toho je nutno uvažovat i vzájemné vztahy mezi mikroorganismy. Z výsledků této části pokusů vyplynulo, že nejlépe z testovaných kmenů roste *Enterobacter cloacae*.

Při růstu využívá nejvíce těkavých kyselin a také nejvíce snižuje obsah rozpuštěných organických látek v médiu.

Nejvyšší obsah rozpuštěných organických látek i těkavých kyselin byl zjištěn v oxidačních produktech lignitu. To je v souladu se skutečností, že mladší druhy uhlí poskytují při degradaci větší množství látek alifatické povahy [11]. Přesto však se největší nárůst biomasy projevil u hnědé uhlí Kapucín a nikoli u lignitu,



Obr. 3. Přirůstky biomasy (ΔX), úbytky volných těkavých kyselin (ΔTK) a pokles obsahu rozpuštěných organických látek ($\Delta CHSK$) při kultivacích *Enterobacter cloacae* v závislosti na koncentraci oxidačních produktů hnědé uhlí Kapucín v médiu

což zřejmě souvisí s větší hodnotou poměru TK/CHSK u hnědé uhlí. U hnědé uhlí bylo v průběhu kultivace utilizováno 60 až 70 % počátečního obsahu těkavých kyselin, kdežto u lignitu a uhelných kalů maximálně 40 %.

Stupeň využití TK k růstu závisí na inhibičních účincích látek obsažených v oxidačních produktech. Je známo, že inhibiči aerobního biologického zpracování uhelných hmot působí hlavně siřičitany a kyanidy [12], což se projevuje hlavně prodloužením lag-fáze. Je proto zřejmé, že přestože některé druhy bakterií jsou schopné využívat k růstu kromě těkavých kyselin i jiné látky z oxidačních produktů uhelné hmoty, budou přirůstky biomasy vyšší v médiu s větším poměrem TK/CHSK vzhledem k pravděpodobně nižšímu obsahu uvedených inhibičních látek.

3.2 Stanovení optimální koncentrace oxidačních produktů v médiu z hlediska jejich využití k růstu a jejich biologické degradace

Tato část práce byla zaměřena na stanovení optimální koncentrace oxidačních produktů v médiu vzhledem k růstu a naopak i vzhledem k odbourání rozpuštěných organických látek. Protože od živného média byl přidáván též kvasničný autolýzát, byl sledován vliv zředění i přidavku startéru (autolýzát) na utilizaci uhelné hmoty. Vzhledem k výsledkům získaným v první části práce byly tyto pokusy prováděny s kulturou *Enterobacter* a jako zdroj uhlíku byly použity oxidační produkty hnědé uhlí Kapucín. Výsledky jsou shrnuty na obr. 3.

V rozsahu koncentrací od 100 do 15 % oxidačních produktů v médiu je patrný pokles přirůstku biomasy ovlivněný obsahem látek využitelných k růstu buněk.

Podobnou závislost vykazují také úbytky těkavých kyselin. Při ředěních větších než 50 % obj. byly těkavé kyseliny v průběhu kultivace zcela utlizovány. Výrazný nárůst biomasy se projevil zvláště při vyšších zředěních, což lze přičítat efektu zředění inhibitorů růstu.

Pokles obsahu rozpuštěných organických látek na konci kultivace byl též výrazně závislý na koncentraci oxidačních produktů v médiu. U neředěných oxidačních produktů poklesla hodnota CHSK o 20 %, při zředění do 50 % byl pokles CHSK v rozsahu 35 až 40 % a při zředění větším než 50 % bylo odbouráno 90 až 95 % původního obsahu rozpuštěných organických látek. Je zajímavé, že ve všech případech byl průběh poklesu CHSK v průběhu kultivace spojitý bez výchylek.

Z výsledků této série pokusů vyplývá, že pro získání maximálního přírůstu biomasy a současně se zřetelem na spotřebu technologické vody je optimální koncentrace v rozsahu 25 až 30 % oxidačních produktů v médiu. Pro dočištění odpadní vody však zbývá po kultivaci odbourat ještě asi 5 % počáteční hodnoty CHSK, což je 600 až 900 mg O_2/l . Z hlediska biologické oxidace je optimální zředění v rozsahu 30 až 40 % původní koncentrace oxidačních produktů v médiu.

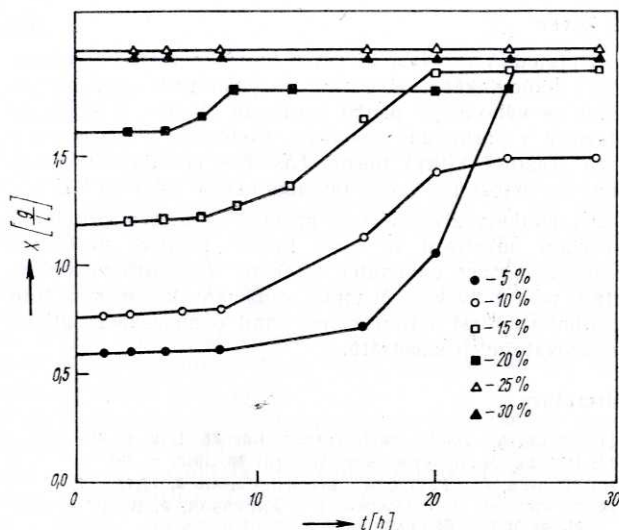
Pro porovnání vztahu mezi účinností biologického odbourání rozpuštěných organických látek a jejich utlizací k nárůstu biomasy byl proveden pokus se směsnou kulturou. Při použití směsné kultury byl nárůst biomasy o 40 % nižší, úbytek těkavých kyselin trojnásobně větší a odbourání organických látek o 20 % lepší v porovnání s kulturou *Enterobacter cloacae*. Je tedy zřejmé, že pro biologickou oxidaci je výhodnější použít směsnou kulturu.

3.3 Vliv zředění inhibitorů na růst biomasy a odbourání rozpuštěných organických látek

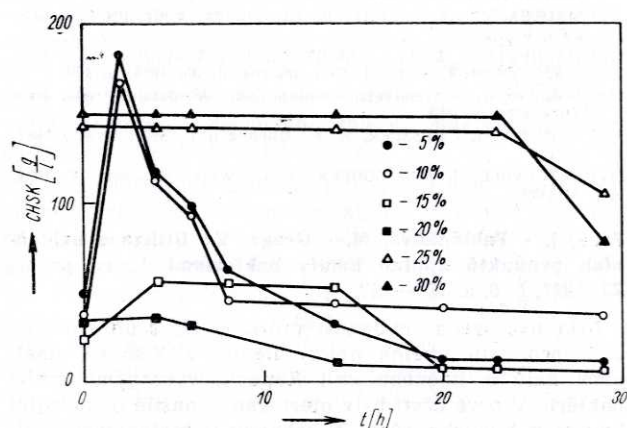
V této části práce byl sledován vliv pouhého zředění oxidačních produktů hnědého uhlí Kapucín (bez přídavku růstových látek — autolýzátu). K pokusům bylo použito kultury izolované ze zaživačního traktu *Neotermes castaneus*. Rozsah koncentrace oxidačních produktů byl zvolen od 5 do 30 %. Na rozdíl od předchozí série pokusů neměly průběhy CHSK a TK trvale sestupný charakter a výsledky jsou proto uvedeny v časových závislostech.

Obrázek 4 ukazuje růstové křivky pro jednotlivá zředění. Je zřejmé, že zředění má významný vliv na růst biomasy. Nárůst biomasy se projevil v rozsahu koncentrací 5 až 20 %. V porovnání s výsledky předchozí série pokusů byly však přírůstky biomasy podstatně nižší. Při koncentraci oxidačních produktů nad 20 % již nárůst biomasy nenastal, zřejmě vlivem vysoké koncentrace inhibitorů.

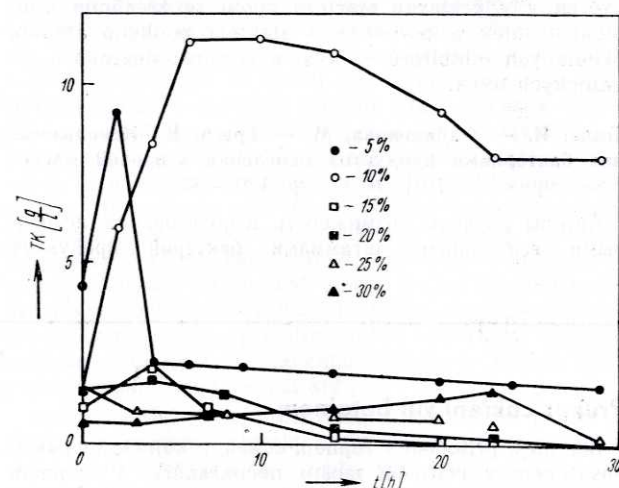
Změny v obsahu rozpuštěných organických látek v průběhu kultivace jsou uvedeny na obr. 5. Při nízké koncentraci oxidačních produktů v médiu (5 a 10 %) vzrůstala zpočátku v lag-fázi výrazně hodnota CHSK, což lze vysvětlit biotransformací substrátu. K růstu potom kultura využívala produktů biotransformace (minimálně i organických kyselin), což vyplývá z následujícího poklesu hodnot CHSK a TK (obr. 5 a 6). Při ředění 10 % se projevila anomálie ve vysoké koncentraci těkavých kyselin obsažených v médiu. Při koncentraci 15 % probíhal proces biotransformace již daleko pomaleji, zřejmě vlivem vyšší koncentrace inhibitorů v médiu. Při dalším zvýšení obsahu oxidačních produktů v médiu je koncentrace inhibičních látek již tak vysoká, že biotransformace nastává až po dlouhé době adaptace a látky vytvořené biotransformací jsou pouze oxidovány, aniž by se uvolněná energie využívala k růstu.



Obr. 4. Vliv počáteční koncentrace oxidačních produktů hnědého uhlí Kapucín na průběh růstové křivky bakterie izolované z *Neotermes castaneus*



Obr. 5. Změny v obsahu rozpuštěných organických látek při kultivaci bakterie izolované z *Neotermes castaneus* v médiu obsahujícím různé počáteční koncentrace oxidačních produktů hnědého uhlí Kapucín



Obr. 6. Změny v obsahu volných těkavých kyselin při kultivaci bakterie izolované z *Neotermes castaneus* v médiu obsahujícím různé počáteční koncentrace oxidačních produktů hnědého uhlí Kapucín

4. Závěr

Z výsledků vyplývá, že jak z hlediska tvorby biomasy, tak i biologického odbourání rozpuštěných organických látek je výhodnější použít současně zředění a přidavku startéru v porovnání s pouhým zředěním. Přidavek startéru (růstové látky) působí částečně potlačení inhibice tím, že umožňuje vznik metabolického bypassu [12].

Při pouhém zředění bez přidavku startéru probíhá užitizace substrátu ve dvou fázích. Nejprve probíhá biotransformace původních látek na látky užitizovatelné, které poté byly více či méně využívány k nárůstu. Toto zjištění souhlasí s literárními údaji o degradaci obtížně užitizovatelných substrátů.

Literatura

- [1] GALLE, E.: Zentbl. Bact. Parasit. Kde **28**, 1910, s. 461
- [2] POTTER, M. C.: Proc. Roy. Soc. (B) **80**, 1918, s. 239
- [3] FISCHER, F. - FUCHS, W.: Brennst.-Chemie **8**, 1927, s. 231
- [4] ROGOFF, M. H. - WEADER, I. - ANDERSON, R. B.: U. S. Bur. Mines I. C. 8075, 1962, s. 88
- [5] GRÉGR, V. - LUKEŠ, J. - ŽÍŽKA, M. - TOMÍČEK, J.: Patent ČSSR, 105 378 (1962)
- [6] PÁCA, J.: Sborník VŠCHT, E 43, 1975, s. 67
- [7] HOFMAN, P. a spol.: Jednotné metody chemického rozboru vod. SNTL, Praha, 1965, s. 432
- [8] MADĚRA, V. a spol.: Příručka pro analýzu vody. SNTL, Praha, 1961, s. 156
- [9] HADJIPETROU, L. P. - GERRITS, J. P. - TELLINGS, F. A. G. - STOUTHAMER, A. H.: J. Gen. Microbiol. **36**, 1964, s. 139
- [10] DOELLE, H. W.: Bacterial Metabolism, Academic Press, New York 1969, s. 353
- [11] HUBÁČEK, J. - KESSLER, M. F.: Chemie uhlí, SNTL Praha 1962, s. 238
- [12] CATCHPOLE, J. R. - COOPER, R. L.: Water Research **6**, 1972, s. 1459

Páca, J. - Fabiánková, M. - Grégr, V.: Utilizace oxidačních produktů uhlé hmoty bakteriemi. Kvas. prům., 23, 1977, č. 6, s. 129—132.

Byla ověřována schopnost užitizace tří druhů oxidačních produktů uhlé hmoty lignitu z Višňové, uhlých kalů a hnědého uhlí Kapucín vybranými druhy bakterií. V první části byly otestovány použité bakteriální kmeny z hlediska růstu a schopnosti biologického odbourání rozpuštěných organických látek. Byla stanovena optimální koncentrace oxidačních produktů pro dosažení maximálního přírůstu biomasy a naopak pro účinné biologické odbourání se zřetelem na minimální spotřebu technologické vody nutné ke zředění. Byl též ověřen vliv přidavku startéru spolu se zředěním inhibičních látek a porovnán s efektem pouhého zředění přítomných inhibitorů na růst a rychlost degradace organických látek.

Паца, И. — Фабианкова, М. — Грегр, В.: Использование бактериями продуктов окисления угольной массы. Квас. прум. 23, 1977, № 6, стр. 129—132.

Авторы изучали возможность использования некоторыми выбранными штаммами бактерий продуктов

окисления трех разных сортов угля, т. е. lignита из шахты Вишньова, угольного шлама и бурого угля сорта Капучин. В первых фазах работ выбранные штаммы бактерий подверглись испытаниям для определения их способности размножаться и биологически расщеплять растворенные органические вещества. Была установлена оптимальная концентрация продуктов окисления, обеспечивающая максимальный выход биологической массы и эффективную биологическую деструкцию при минимальном расходе воды нужной для разбавления. Сравнивалось влияние на размножение бактерий и скорость разложения органических веществ добавки закваски и одновременного разбавления ингибирующих составляющих с влиянием такого разбавления без добавки закваски.

Páca, J. - Fabiánková, M. - Grégr, V.: Utilization by Bacteria Oxidation Products of Coal Substance. Kvas. prům. 23, 1977, No. 6, pp. 129—132.

The authors have studied conditions under which selected kinds of bacteria can utilize oxidation products of the following coal substances: lignite from the Višňová mine, coal slurry and „Kapucín“ brown coal. In the first part of research works selected bacteria strains were tested to ascertain their growth capacity and ability to degrade biologically dissolved organic matter. The article deals further with a searching of the optimum concentration of oxidation products giving maximum growth yield as well as an efficient biological degradation with minimum consumption of technological water. Stimulative effects of the starter addition and thinning of inhibiting components are compared with effects of mere thinning upon the multiplication of bacteria and degradation rate of organic matter.

Páca, J. - Fabiánková, M. - Grégr, V.: Ausnützung der Oxydationsprodukte der Kohlensubstanz durch Bakterien. Kvas. prům. 23, 1977, No. 6, S. 129—132.

Es wurde bei ausgewählten Bakterienarten ihre Fähigkeit verfolgt, drei Arten der Oxydationsprodukte der Kohlensubstanz — Lignit aus Višňová, Kohlschlamm und Braunkohle Kapucín — auszunützen. In dem ersten Abschnitt der Arbeit wurden die geprüften Bakterienstämme auf Wachstum und Fähigkeit des biologischen Abbaus gelöster organischer Substanzen getestet. Es wurde die Optimalkonzentration der Oxydationsprodukte für die Erreichung des maximalen Biomassezuwachses oder zum Gegenteil für den effektiven biologischen Abbau mit Hinsicht auf den Minimalverbrauch des technologischen Verdünnungswassers bestimmt. Er wurde auch der Einfluß der Starter-Zugabe kombiniert mit der Verdünnung der Inhibitionssubstanzen erprobt und mit dem Effekt der bloßen Verdünnung der anwesenden Inhibitoren auf das Wachstum und die Geschwindigkeit der Degradation der organischen Substanzen verglichen.