

Denitrifikace vody imobilizovanými buňkami bakterie *Paracoccus denitrificans*

579

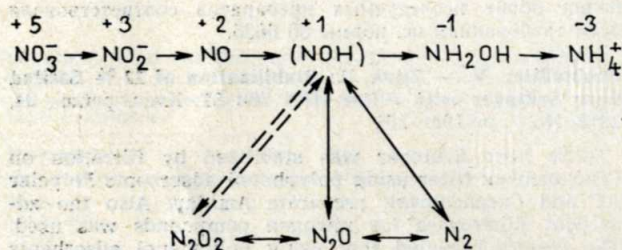
Ing. SIMONA ČIŽINSKÁ, Ing. VÍT MATEJŮ, TOMÁŠ JANOCH, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: denitrifikace, imobilizace, *Paracoccus denitrificans*, pitná voda, kultivace, nitraty

ÚVOD

Kvalita vodních zdrojů se stává závažným ekologickým problémem. Mezi nejsledovanější ukazatele jakosti pitné vody patří oxidované formy dusíku, které svými toxickými a kancerogenními účinky ohrožují zdraví lidí i zvířat. Přítomnost nitratů, popř. nitritů v prostředí souvisí zejména s jejich využíváním v zemědělství, v potravinářském a chemickém průmyslu. Bilance denního příjmu nitratů z vody, potravin, inhalací i ostatních zdrojů ukazuje, že vodárenská denitrifikace tento příjem snižuje až o 50 % [1].

Způsob eliminace nitratů ve vodárenských úpravných nebyl dosud uspokojivě vyřešen. Aplikace metod fyzikálních a fyzikálně-chemických je obvykle spojena s negativním ovlivněním celkového aniontového složení upravené vody a s vysokými provozními náklady. Navíc při regeneraci vznikají odpadní vody s vysokým obsahem nitratů, které se většinou vrací do životního prostředí. Ekonomické studie a zkušenosti z poloprodučních a provozních denitrifikačních stanic nejpříznivěji hodnotí biologickou heterotrofní denitrifikaci [2]. Při disimilační denitrifikaci je nitrat v přítomnosti donoru elektronů redukován sledem enzymových reakcí až na plynný dusík (obr. 1) [3].



Obr. 1. Biochemická cesta nitratové asimilace a disimilace

Většina dosud ověřovaných biologických metod využívá znalostí z oblasti imobilizovaných biosystémů. Jedná se především o fyzikální a fyzikálně-chemickou adsorpci buněk na pevné nosiče nerozpustné ve vodě [4–6]. V literatuře jsou popsány postupy vodárenské denitrifikace s taxonomicky definovanými bakteriálními druhy i směsnými buněčnými kulturami.

Ve snaze vyřešit technologické nedostatky výroby a využití buněčných katalyzátorů byla vypracována do značné míry univerzální metoda přípravy různých imobilizovaných prokaryontních i eukaryontních buněk [7]. Tato technologie byla zvolena i pro imobilizaci buněk s denitrifikační aktivitou, tj. směsné populace aktivovaného kalu nebo bakterie *Paracoccus denitrificans*. Byly ověřeny různé způsoby zpevnění imobilizovaných buněk směsné populace aktivovaného kalu, vlastnosti buněčných agregátů při jednorázové i kontinuální denitrifikaci modelové a podzemní vody [8,9]. Denitrifikační účinnost směsné kultury byla porovnávána s aktivitou imobilizovaných buněk fakultativně anaerobní půdní bakterie *P. denitrificans*, jež patří mezi modelové mikroorganismy při výzkumu vlastností nitratového respiračního řetězce.

MATERIÁL A METODY

Biologický materiál

Bakterie *P. denitrificans* CCM 982 (NCIB 8944) z Československé sbírky mikroorganismů na Universitě J. E. Purkyně v Brně byla kultivována v 300 l fermentoru (Bio-

engineering A.G., Wald, Švýcarsko) za sterilních podmínek při teplotě 30 °C a pH 7,3.

Tekutá živná půda obsahovala v 1 litru: 5,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 4,07 g KH_2PO_4 ; 1,60 g NH_4Cl ; 1,01 g KNO_3 ; 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,13 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g citranu železitého a 9,0 g glukosy.

Po 48 hodinách růstu bakterií za anaerobních podmínek bylo získáno 400 g buněčné pasty *P. denitrificans* se sušinou 16,1 %, což odpovídalo nárůstu 0,29 g suché hmoty buněk na 1 litr živné půdy.

Druhá kultivace byla provedena stejným způsobem, avšak za mírného provzdušňování (0,15 l vzduchu na 1 litr živné půdy za minutu), přívod vzduchu byl zastaven na posledních 5 hodin kultivace. Tímto způsobem bylo dosaženo nárůstu 0,81 g suché hmoty buněk v litru živné půdy.

Imobilizace buněk

Princip přípravy biokatalyzátoru spočívá ve vzájemné chemické imobilizaci buněk do formy kovalentně vázaných buněčných agregátů s reaktivním polymerem rozpustným ve vodě.

Částice byly dále zpevňovány přidávkou koreagující látky (technická vaječná bílkovina). Polymer vzniká reakcí větveného polyethyleniminu s glutaraldehydem [10].

Modelová voda

Pražská vodovodní voda obohacená nitrátem a přidávkou glukosy na koncentraci 100 mg.l^{-1} .

Specifická denitrifikační rychlost

Specifická denitrifikační rychlost (SDR) vyjadřuje mg zredukovaného nitratu jedním g biologického materiálu s denitrifikační aktivitou za hodinu.

Chemický rozbor vody

Pro hodnocení kvality vody a jejího chemického složení bylo použito běžných metod [11].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Kinetickým testem s modelovou vodou o počáteční koncentraci 120 mg.l^{-1} NO_3^- byla stanovena SDR nativních buněk *P. denitrificans* (obr. 2). Při kultivaci za aerobních podmínek bylo dosaženo SDR získané biomasy 58,5 $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, při kultivaci za anaerobních podmínek 125,9 $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

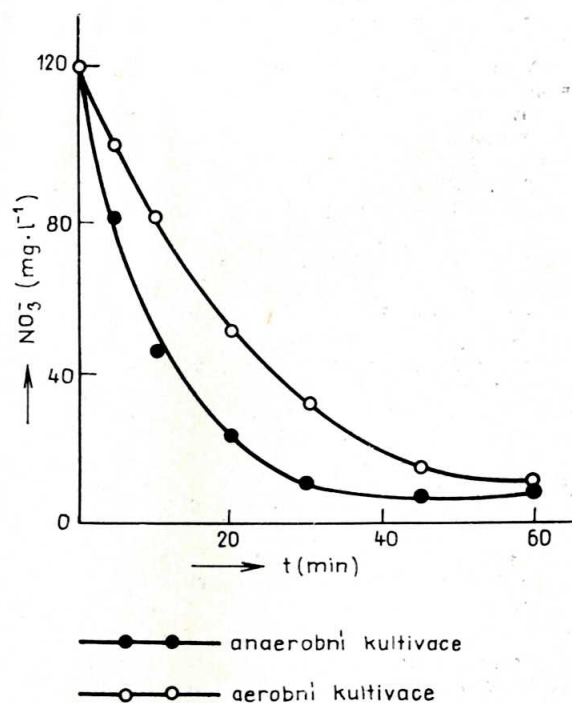
Změny v nárůstu buněk a aktivitě denitrifikačních enzymů při kultivaci za aerobních a anaerobních podmínek souhlasí s jinými údaji z literatury [12,13].

Obě buněčné pasty byly imobilizovány a denitrifikační aktivita buněčných agregátů byla zjišťována při kontinuální úpravě modelové vody ve skleněné koloně o vnitřním průměru 26 mm a výšce 250 mm (tabulka 1 a 2).

Vysoká denitrifikační aktivita nativního biologického materiálu se imobilizací podstatně snížila. SDR poklesla z původních 125,9 $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, resp. 58,5 $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ u neimobilizovaných buněk na průměrnou hodnotu zjištěnou za 30 dní denitrifikace vody imobilizovanými buňkami 1,01 $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, resp. 0,93 $\text{mg.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Výsledná SDR se významně nelišila pro biokatalyzátory připravené z biomasy kultivované za aerobních a anaerobních podmínek. Průměrný pokles SDR činil 98,8 % oproti nativní kultuře.

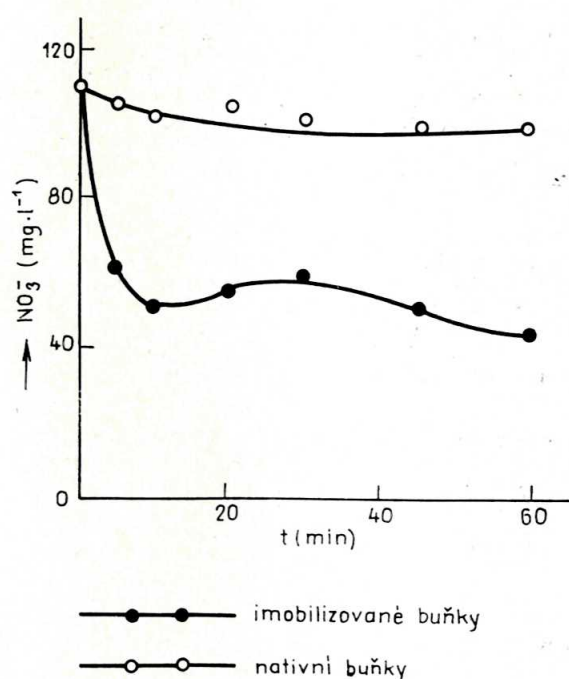
Zároveň bylo potvrzeno, že až 100 % nasycení vody kyslíkem nesnižuje rychlost nitratové respirace imobilizovaných buněk *P. denitrificans* na rozdíl od nativních buněk (obr. 3). Tyto výsledky odporují dosud uváděným údajům v literatuře [14,15]. Pouze v případě membrá-

nových fragmentů, permeabilizace cytoplasmatické membrány nebo v přítomnosti rozpojovačů si buňky zachovávají



Obr. 2. Kinetika denitrifikace modelové vody bakterií *P. denitrificans*, kultivovanou za aerobních a anaerobních podmínek

Podmínky: 1 litr buněčné suspenze o sušině 3,68 g.l⁻¹, teplota 17,5 °C, pH 7,3, anaerobní podmínky kinetického testu.



Obr. 3. Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku na disimilační denitrifikaci nativních a imobilizovaných buněk *P. denitrificans*.

Podmínky: 20,0 g.l⁻¹ imobilizovaných agregátů nebo 1 litr suspenze o sušině 3,50 g.l⁻¹ buněk, modelová voda s koncentrací 110 mg.l⁻¹ NO₃⁻, teplota 19,5 °C, pH 7,2, suspenze provzdušňována stlačeným vzduchem, koncentrace rozpuštěného kyslíku 8,30 mg.l⁻¹.

Tabulka 1. Kontinuální denitrifikace vody imobilizovaných buňkami *P. denitrificans* kultivovaných za anaerobních podmínek

Čas (dny)	Modelová voda		Upravená voda		SDR (mg.g ⁻¹ .h ⁻¹)
	Průtok (ml.h ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	
5	102	105,85	56,39	8,64	0,91
10	110	106,34	68,37	3,87	0,82
15	105	108,15	57,42	3,24	1,09
20	120	100,88	58,92	2,69	1,03
25	115	101,52	55,88	1,08	1,12
30	100	102,62	51,73	1,02	1,09

Podmínky: 15 g buněčných agregátů o sušině 30,5 %; pevná vrstva biokatalyzátoru; vzestupný tok modelové vody; teplota 18 °C; pH 7,2; v tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty za 5 dní.

Tabulka 2. Kontinuální denitrifikace vody imobilizovaných buňkami *P. denitrificans* kultivovaných za aerobních podmínek

Čas (dny)	Modelová voda		Upravená voda		SDR (mg.g ⁻¹ .h ⁻¹)
	Průtok (ml.h ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₃ ⁻ (mg.l ⁻¹)	NO ₂ ⁻ (mg.l ⁻¹)	
5	100	108,43	65,41	6,42	0,80
10	104	102,15	60,95	3,81	0,85
15	101	110,41	64,93	2,45	0,95
20	115	100,20	58,60	2,22	0,99
25	115	103,80	62,24	1,38	1,01
30	110	101,52	58,58	1,35	1,00

Podmínky: 15 g buněčných agregátů o sušině 30,5 %; kolona s pevnou vrstvou biokatalyzátoru; vzestupný tok modelové vody; teplota 18 °C; pH 7,2; v tabulce jsou průměrné hodnoty za 5 dní

vávají schopnost redukce nitratů v přítomnosti kyslíku [16, 17].

Tuto vlastnost biokatalyzátoru lze vysvětlit porušením integrity cytoplasmatické membrány imobilizací. Dochází ke změně membránového potenciálu, ke zvýšené intenzitě elektronového toku k NO₂⁻-reduktase a následné tvorbě dusíkatých intermediátů v koncentracích dostatečných pro inhibici terminálních oxidas [18].

Při sledování ostatních ukazatelů jakosti vody se neměnila koncentrace železa, manganu, amonných iontů, chloridů a síranů v modelové a upravené vodě, snižovala se koncentrace fosfatů a zvyšovala se koncentrace nitritů, celková tvrdost vody a chemická spotřeba kyslíku v upravené vodě. Negativně ovlivňuje kvalitu vody pro pitné účely pouze překročení maximální přípustné koncentrace nitritů a chemické spotřeby kyslíku. Z dřívějších prací [9] však vyplynulo, že pro jejich snížení postačí jednostupňová úprava vody filtrací přes vodárenský písek, popř. chemická oxidace nitritů.

Při srovnání aktivity imobilizovaných buněk *P. denitrificans* a směsné populace aktivovaného kalu [9] lze konstatovat, že čistá bakteriální populace je citlivější k použité imobilizační metodě.

Aktivita imobilizovaných buněk aktivovaného kalu byla sledována v poloprovozním měřítku v jihočeské vodárně v Miroticích. Podzemní voda s koncentrací 44,0 až 92,0 mg.l⁻¹ NO₃⁻ a s přidavkem ethanolu v množství 25,0 až 30,0 mg.l⁻¹ byla čerpána do kolony s 2,0 kg biokatalyzátoru v množství 16,0 až 26,0 l.h⁻¹ [9]. Během 3 měsíců byla zjištěna průměrná SDR 2,17 mg.g⁻¹.h⁻¹, což představuje 93,0% pokles denitrifikační aktivity neimobilizovaných buněk.

Z výsledků vyplývá, že pro přípravu imobilizovaných buněk s denitrifikační aktivitou je vhodnější použití směsné populace aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod se SDR minimálně 20 mg.g⁻¹.h⁻¹. Tato biomasa je dostupná ve velkém množství s minimálními náklady a zajišťuje lepší biochemické vlastnosti biokatalyzátoru.

Literatura

- [1] ANONYM: Guidelines for drinking water. World Health Organization, Geneva, 1984.

- [2] FAUP, G. M., LEPRINCE, A., FIESSINGER, F.: Sb. Moderní metody čištění odpadních vod, ČSVTS Příbram, 1984, s. 31.
- [3] PAINTER, H. A.: Water Res. **4**, 1970, s. 393.
- [4] RICHARD, Y., SCHNEIDER, P.: Gas, Wasser Abwasser **65**, 1985, s. 414.
- [5] PHILIPOT, J. N., CHAFFANGE, F., PASCAL, O.: Water Supply **3**, 1985, s. 93.
- [6] KURT, M., DUNN, I. J., BOURNE, J. R.: Biotechnol. Bioeng. **29**, 1987, s. 493.
- [7] Pat. ČSSR 231 458.
- [8] MAIXNER, J., ČIŽINSKÁ, S., VOJTÍŠEK, V.: Vodní hosp. **B/10**, 1986, s. 278.
- [9] MAIXNER, J., ČIŽINSKÁ, S., HAVLÍN, V., JINDRA, J.: Vodní hosp. **B/7**, 1987, s. 179.
- [10] Pat. ČSSR 245 584.
- [11] HORÁKOVÁ M., LISCHÉ, P., PEKÁRKOVÁ, K., GRÜNWARD, A.: Metody chemické analýzy vod. Učební texty VŠCHT Praha, SNTL 1981.
- [12] KUČERA, I., BOUBLÍKOVÁ, P., DADÁK, V.: Folia Microbiol. **29**, 1984, s. 108.
- [13] LAM, Y., NICHOLAS, D. J. D.: Biochim. Biophys. Acta **172**, 1969, s. 450.
- [14] KAPRÁLEK, F.: Sb. Anaerobní fermentace, Bechyně 1981, Čs. spol. mikrobiol. ČSAV, Praha, 1982, s. 58.
- [15] FOCHT, D. D., CHANG, A. C.: Adv. Appl. Microbiol. **19**, 1975, s. 153.
- [16] JOHN, P.: J. Gen. Microbiol. **98**, 1977, s. 231.
- [17] KUČERA, I., KARLOVSKÝ, P., DADÁK, V.: Biologia **37**, 1982, s. 809.
- [18] KUČERA, I., KOZÁK, L., DADÁK, V.: FEBS Lett. **205**, 1986, s. 333.

Lektoroval Ing. Miroslav Sobotka, CSc.

Čížinská, S. — Matějů, V. — Janoch, T.: Denitrifikace vody imobilizovanými buňkami *Paracoccus denitrificans*. Kvas. prům., **34**, 1988, č. 7, s. 202—204

Modelová voda byla denitrifikována půdní bakterií *Paracoccus denitrificans*, chemicky imobilizovanou reaktivním polymerem rozpustným ve vodě. Byla porovnávána denitrifikační účinnost nativních a imobilizovaných buněk, kultivovaných za aerobních a anaerobních podmínek. Nitráty v modelové vodě byly průměrně redukovány rychlostí 0,97 mg NO₃⁻ na 1 g suché hmoty imobilizovaných buněk za hodinu po dobu jednoho měsíce.

Чижинская, С. — Матеев, В. — Янох, Т.: Денитрификация воды имобилизованными клетками *Paracoccus denitrificans*. Квас. прум., **34**, 1988, № 7, стр. 202—204.

Исследуемая вода подверглась денитрификации почвенной бактерией *Paracoccus denitrificans*, химически имобилизованной реактивным полимером растворимым в воде. Была сопоставлена эффективность денитрификации нативных и имобилизованных клеток, культивированных при аэробных и анаэробных условиях. Нитраты в исследуемой воде в среднем восстанавливались скоростью 0,97 мг на 1 г сухого вещества имобилизованных клеток за час в продолжение одного месяца.

Čížinská, S. — Matějů, V. — Janoch, T.: Water Denitrification with immobilized Cells of *Paracoccus denitrificans*. Kvas. prům., **34**, 1988, No. 7, pp 202—204

The water was denitrified with the soil bacterium *Paracoccus denitrificans*. The cells were chemically immobilized with the water soluble reactive polymer. The denitrifying efficiency of native and immobilized cells cultivated under aerobic and anaerobic conditions were compared. Nitrates in the water were reduced by the mean rate of 0,97 mg NO₃⁻ per 1 g dry weight of immobilized cells per hour during one month.

Čížinská, S. — Matějů, V. — Janoch, T.: Denitrifikation des Wassers durch immobilisierte Zellen von *Paracoccus denitrificans*. Kvas. prům., **34**, 1988, Nr. 7, S. 202—204

Das Modellwasser wurde durch die Bodenbakterien *Paracoccus denitrificans*, die mittels eines wasserlöslichen reaktiven Polymers chemisch immobilisiert wurde, denitrifiziert. Es wurde die Denitrifikationswirkung der nativen und immobilisierten Zellen verglichen, die unter aeroben und anaeroben Bedingungen kultiviert wurden. Die Nitrate im Modellwasser wurden im Durchschnitt mit einer Geschwindigkeit von 0,97 mg NO₃⁻ pro 1 g Trockensubstanz immobilisierter Zellen binnen 1 Stunde in der Dauer von 1 Monat reduziert.