

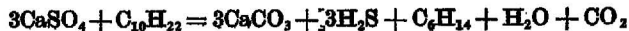
ROLA MIKROORGANIZMÓW W PROCESIE POWSTAWANIA ZŁÓŻ SIARKI OKOLIC PODKARPACIA

UKD 553.661.061.15:550.72:550.8.023 (438—12 okolice Podkarpacia)

Badając przyczyny występowania siarkowodoru w powierzchniowych i gruntowych wodach okolic Karpat stwierdziliśmy, że zachodzi tam proces mikrobiologicznej redukcji występującego w tych okolicach gipsu. Zjawisko to zostało udokumentowane poprzez wyizolowanie z siarkowodorowych wód okolic Buśka bakterii *Desulfovibrio desulfuricans* i sztuczne odtworzenie w laboratorium biologicznego środowiska powstawania siarkowodoru (2*—7). W ten sposób eksperymentalnie przestudiowano warunki procesu, wyprowadzono odpowiednie równania kinetyczne i obliczono rząd i stałe szybkości reakcji (3). Proces ten realizowano poprzez wykorzystanie energii z rozkładu związków organicznych, znajdujących się w stosowanej w doświadczeniach pożywce Starkeya.

* Praca stanowi fragment rozprawy doktorskiej mgr Jana Gąsiorka.

Przeprowadzone badania przemawiają w pewnym sensie za poglądem o mikrobiologicznym powstawaniu złóż siarki, występującej w okolicach Karpat (8—13). Pomijając bowiem specyficznie porowaty wygląd wapieni pochodzących ze złóż siarkowych i wskazujący na procesy odgazowania w toku tworzenia się siarki (wydzielenie H_2S), argumentem przemawiającym za biologiczną teorią ich formowania się jest dokonująca się nadal mikrobiologiczna redukcja, zachodząca pod wpływem bakterii siarkowych. Jednym z etapów tego procesu jest redukcja gipsów do siarkowodoru (14) wywołana bakteriami szczepu *Desulfovibrio*, której mechanizm, w świetle literatury, jest najmniej wyjaśniony (5). Ten pierwszy etap, związany z powstawaniem siarkowodoru, wynika najogólniej z reakcji:



W drugim etapie żyjące na granicy zasięgu tlenu aerobowe bakterie siarkowe utleniają H_2S do siarki elementarnej.

Odtwarzając w laboratorium przebieg mikrobiologicznej redukcji gipsów zamierzamy w tej pracy skoncentrować się nad wynikami badań aktywności zarówno wód naturalnych, jak i wyizolowanych szczepów *Desulfovibrio*, oraz nad wpływem na ten proces niektórych wód solankowych i związków organicznych.

METODYKA BADAŃ

Najbardziej aktywny szczep *Desulfovibrio* wyizolowano ze źródła 8a, eksploatowanego przez Uzdrowisko „Busko” i wykorzystano do badań kinetycznych nad mikrobiologiczną redukcją gipsów, pobranych do tego celu w Skorocicach k. Buska. Oczyszczanie wód oraz izolację czystej kultury realizowano drogą kolejnych przeszczepów przy współudziale pracowników Zakładu Mikrobiologii AR w Poznaniu (7), natomiast efekty końcowe kontrolowano metodą mikroskopową.

Gips stosowany w doświadczeniach, po rozdrobnieniu do rozmiaru cząstek od 0 do 3 mm, przed wprowadzeniem do badań poddano analizie chemicznej i granulometrycznej. Z analizy chemicznej wynika, że zawiera on 6,5% rozpuszczalnych w wodzie siarczanów w stosunku do 57,4% całkowitej ilości SO_4^{2-} . Wyniki analizy granulometrycznej zilustrowano na ryc. 1.

W doświadczeniach proces redukcji gipsów realizowano przy udziale zarówno naturalnych zespołów bakterii, jak i hodowli czystych szczepów *Desulfovibrio*. Zawsze korzystano z pożywek przygotowanych w taki sposób, aby w 1000 ml wody znajdowało się: 5,0 g $CH_3CH(OH)COONa$; 5,5 g $Na_2SO_4 \cdot 10 H_2O$; 2 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; 0,15 g $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$; 0,5 g K_2HPO_4 ; 1 g NH_4Cl ; 0,5 g soli Mohra. Tylko w niektórych doświadczeniach (jak w tabeli) celowo stosowano takie zmiany w składzie, aby móc określić przyswajalną przez szczep substancję organiczną, stanowiącą źródła węgla w warunkach naturalnych.

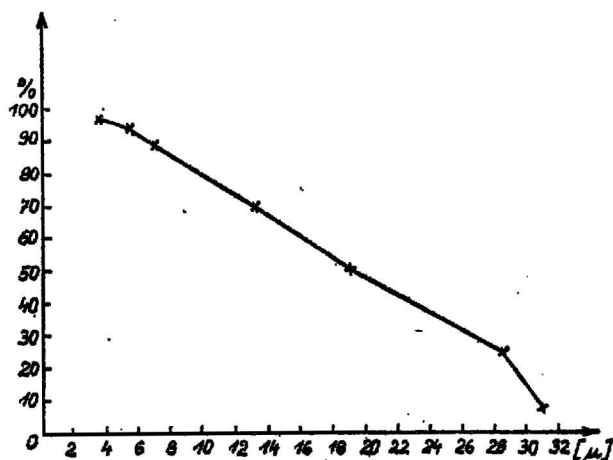
Sam proces redukcji w skali laboratoryjnej przeprowadzono w połączonych szeregowo płuczkach Poleżajewa (ryc. 2) umieszczonych w termostacie.

Do pierwszej płuczki o poj. 50 ml, spełniającej rolę fermentatora, wprowadzono 1 g gipsu i wlewano odpowiednią (jak w tab.) ilość pożywki o określonym składzie. W następnych umieszczono po 5 ml 0,05 M roztworu octanu kadmowego służącego do ilościowego oznaczenia H_2S powstającego w fermentatorze.

W doświadczeniach, w których korzystano z naturalnych wód źródłanych (naturalne zespoły bakterii siarkowych), w fermentatorze umieszczono 10 ml pożywki oraz 10 ml zaszczepu wody źródlanej. W doświadczeniach, w których korzystano z czystych kultur bakterii siarkowych, do reaktora wprowadzono 20 ml pożywki i określoną w tabeli ilość inoculum, pobranego z czystej hodowli *Desulfovibrio* po 48 godz. hodowania. Ze względu na anaerobowy charakter przemiany zestaw do badań przed i po wprowadzeniu zaszczepu przedmuchiwało przez 10 min mieszaniną gazową zawierającą 70% N_2 i 30% CO_2 . Pobierane z butli gazy, przed wprowadzeniem do układu, oczyszczano od śladów tlenu w alkalicznym roztworze pirogallolu. Następnie przedmuchiwanie reaktorów prowadzono 3X na dobę przez 20 min, przepuszczając mieszaninę gazową ($N_2 + CO_2$) z szybkością 10 l/h. Stopień redukcji siarczanów kontrolowano jodometrycznie przez ustalenie ilości wydzielonego H_2S w określonych odstępach czasu (podczas przedmuchiwania reaktorów). Równolegle kontrolowano pH roztworu reakcyjnego. Wszystkie doświadczenia prowadzono w 3 analogicznych zestawach i w ten sposób kontrolowano stopień powtarzalności wyników.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Wspominaliśmy, że większość badaczy przychyliła się do tezy o udziale bakterii w genezie polskich złóż siarki, występujących w zapadlisku przedkarpackim (9–18). Uważa się, że przejście gipsu w



Ryc. 1. Skład granulometryczny badanego gipsu.

Fig. 1. Granulometric composition of the gypsum studied.

siarkonośny wapień następowało pod wpływem mikroorganizmów, czerpiących węgiel ze związków organicznych, np. bituminów (5). Nie brak również poglądów wskazujących na drugorzędą rolę bakterii w procesie powstawania siarki (18).

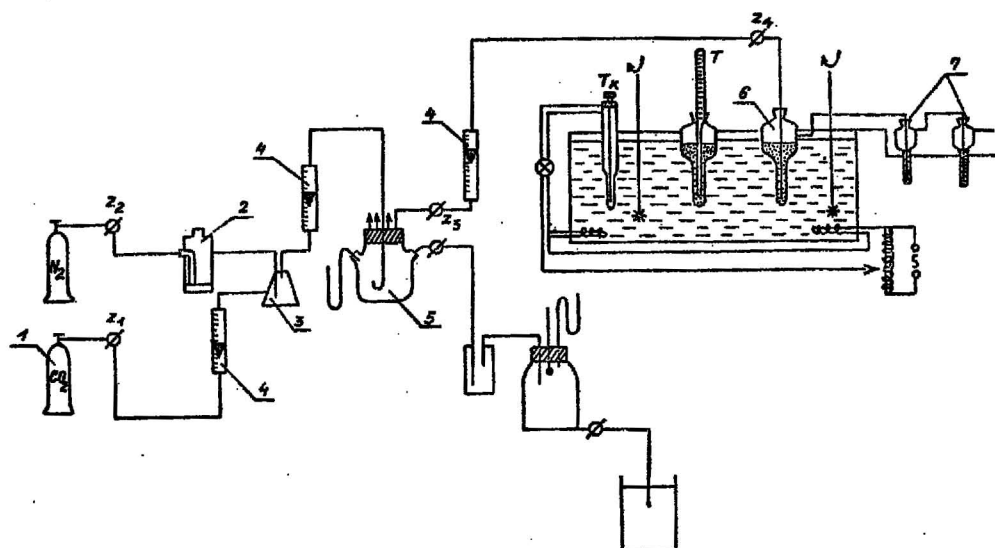
Za współuczestniczeniem bakterii w powstawaniu polskich złóż siarki przemawia również fakt znalezienia w okolicach Karpat szczepu *Desulfovibrio desulfuricans*, który pozwala na sztuczne odtwarzanie w laboratorium środowiska biologicznego powstawania siarkowodoru. Bakterie te przekształcają siarczan wapnia w siarczek kosztem utleniania materiału organicznego, dostarczającego energii i stanowiącego ich pożywienie.

Aktywność zespołu bakterii siarkowych, pobranych z wód naturalnych oraz wyizolowanych kultur czystych, zilustrowano na ryc. 3. Przedstawia on stopień redukcji siarczanów do siarczków w zależności od czasu trwania procesu. Badania prowadzono w trzech różnych środowiskach reakcyjnych o składzie chemicznym pierwiastków podanym w tabeli (doświadczenie 1, 2a i 2b).

Pierwsza krzywa kinetyczna (ryc. 3) ilustruje proces wywołany przez naturalny zespół bakterii siarkowych. Przebieg przemiany w obecności czystych kultur *Desulfovibrio* zilustrowano na krzywej 2a oraz 2b. Różnią się one tym, że w miejsce siarczanów magnezu i sodu, znajdujących się w stosowanej pożywce, w doświadczeniu 2b wprowadzono gips naturalny. Łatwo zauważyć, że przy niezmiennym kształcie krzywych kinetycznych obserwujemy tylko zróżnicowany stopień redukcji. Znacznie wydajniejszy jest bowiem proces mikrobiologicznej redukcji realizowany w pożywce, zawierającej gips naturalny (krzywa 2b), w porównaniu z analogicznym przebiegiem procesu w pożywce zawierającej siarczan rozpuszczalny. Uderzający jest również wyraźnie zróżnicowany okres indukcyjny reakcji (3), krótszy około 10-krotnie w przypadku doświadczeń, w których wykorzystano czystą kulturę bakterii.

Dzięki wprowadzeniu do środowiska reakcyjnego gipsu naturalnego w miejsce rozpuszczalnych siarczanów nastąpiło również niemal dwukrotne skrócenie czasu powstania fazy logarytmicznego wzrostu procesu. Tłumaczymy to korzystniejszą adaptacją do środowiska zawierającego gips naturalny szczepu wyizolowanego, który rozwijał się w nim w sposób ewolucyjny. Nie bez znaczenia jest tu także zawartość zanieczyszczeń organicznych, stanowiących niejako siłę motoryczną tego procesu.

Rozwijając ten problem stwierdziliśmy, że np. CO_2 lub powstający w procesie redukcji $CaCO_3$, a także ropa z rurociągu „Przyjaźń” bądź gaz, zawierający mieszaninę butanu i propanu, nie jest przyswajalny przez bakterie *Desulfovibrio*. Podobnie niepowiodły się doświadczenia, w których w miejsce miedzanu sodowego wprowadzono wódór. Stosowa-



Ryc. 2. Schemat aparatury laboratoryjnej do prowadzenia mikrobiologicznej redukcji siarczanów.

1 — butla gazowa, 2 — płuczka z roztworem pirogalolu, 3 — mieszalnik, 4 — rotometr, 5 — zbiornik wyrównawczy, 6 — reaktor-fermentator, 7 — płuczki absorpcyjne z roztworem Cd^{2+} , Z — zawór, T — termometr, T_k — termometr kontaktowy.

Fig. 2. Scheme of laboratory equipment for studies of microbiological reduction of sulphates.

1 — gas reservoir, 2 — washer with pyrogallol solution, 3 — stirring apparatus, 4 — revolution counter, 5 — compensating reservoir, 6 — reactor — fermentation-chamber, 7 — absorption washers with Cd^{2+} solution, Z — valve, T — thermometer, T_k — contact thermometer.

ZESTAWIENIE SKŁADU CHEMICZNEGO ŚRODOWISKA MIKROBIOLOGICZNEJ REDUKCJI ORAZ WARUNKÓW PROWADZENIA PROCESU

(Zawartość składników podano w mg pierwiastka w 20 ml roztworu)

Symbol doświad. Exp. No	S	C	N	P	K	Ca	Na	Cl	Mg	Fe	Zaszczep inoculum		Temperatura procesu °C Temperature (centigrades)
											rodzaj type	ilość [ml] volume	
1	14,29	16,16	3,01	0,90	2,28	23,21	10,44	67,22	—	0,70	zespół natur. unpurified	10	35
2a	14,94	28,98	5,40	1,62	4,14	0,48	32,40	12,96	3,42	1,26	czysty szczep pure isol. str.	2	
2b	14,10	28,98	5,40	1,62	4,14	16,02	18,54	12,96	—	1,26	czysty szczep pure isol. str.	2	35
a	15,35	32,13	5,95	1,82	4,40	18,21	21,18	12,81	—	1,43	czysty szczep pure isol. str.	0,2	30
b	15,35	32,13	5,95	1,82	4,40	18,21	44,92	49,21	—	1,43	czysty szczep pure isol. str.	0,2	30
c	15,35	32,13	5,95	1,82	4,40	18,21	68,52	85,61	—	1,43	czysty szczep pure isol. str.	0,2	30
3	14,28	28,98	5,40	1,62	4,14	16,46	18,54	12,96	—	1,26	czysty szczep pure isol. str.	2	30

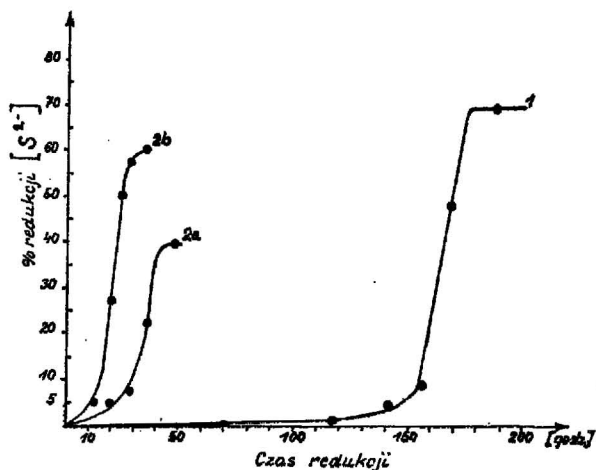
ne w tym przypadku gazy wprowadzano do środowiska reakcyjnego łącznie z mieszaniną azotu i dwutlenku węgla z szybkością do 10 l/h.

Przeprowadzono również dwa równoległe eksperymenty z zastosowaniem 1 g gipsu naturalnego w 20 ml środowiska reakcyjnego oraz 1 g gipsu naturalnego, z którego wyekstrahowano związki organiczne za pomocą etanolu i benzenu. Okazało się, że w pierwszym przypadku w procesie wydzieliło się 0,120 mg siarki w formie H_2S , gdy w reaktorze zawierającym wyekstrahowany gips proces redukcji nie zachodził. W ten sposób ustalono, że źródłem substancji organicznych w warunkach naturalnych są związki węgla, obecne w głęboko usytuowanych złożach gipsu i wapieni pogipsowych, skąd pobierano próbki. Na temat ich składu prowadzone są badania szczegółowe (F. Domka, J. Gasiorek).

Interesowaliśmy się również wrażliwością bakterii *Desulfovibrio* na zawartość NaCl w środowisku. W tym celu przeprowadziliśmy badania nad mikro-

biologiczną redukcją siarczanów w środowisku zawierającym trzy różne podane w tab. stężenia NaCl (doświadczenie a, b, c). Otrzymane odpowiednie krzywe kinetyczne ilustruje ryc. 4. Obok próby odniesienia (a) obserwowaliśmy przebieg redukcji wobec dodatkowo wprowadzonego 3‰ roztworu NaCl w ilości 2 ml (b) i 4 ml (c). Wprowadzenie np. 6 ml tego roztworu do próby odniesienia powodowało całkowite zahamowanie procesu. Najkorzystniej wypadły doświadczenia, w których do badanego roztworu wprowadzono 2 ml 3‰ NaCl. Wydajność procesu w tym przypadku zwiększyła się o 25% (krzywa b) w porównaniu z próbą odniesienia. Dodanie wszakże 4 ml 3‰ NaCl do 20 ml roztworu reakcyjnego doprowadziło aż do 30% obniżenia wydajności reakcji. W konsekwencji stwierdziliśmy, że dla procesu mikrobiologicznej redukcji siarczanów toksycznym stężeniem NaCl jest już roztwór 1‰.

W przeprowadzonych przez nas doświadczeniach, z zastosowaniem z góry określonych warunków, ta-

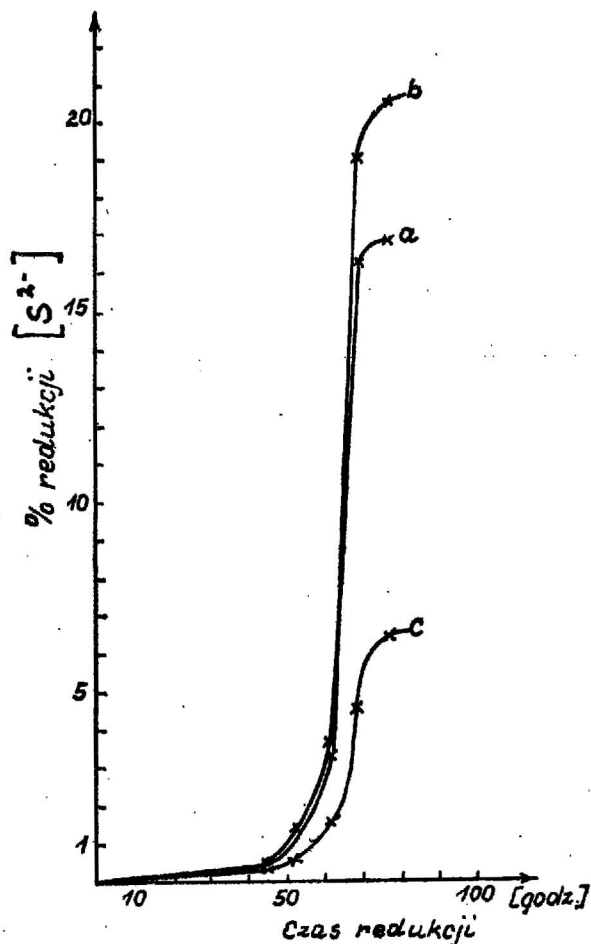


Ryc. 3. Zależność stopnia redukcji gipsu od rodzaju zaszcepu.

1 — zespół naturalny, 2 — czysta hodowla *Desulfovibrio*,
a — pożywka Starkeya, b — pożywka zmodyfikowana.

Fig. 3. Dependence of the degree of gypsum reduction on the type of bacteria introduced.

1 — natural assemblage of bacteria, 2 — pure *Desulfovibrio* culture, a — Starkey's medium, b — modified medium.

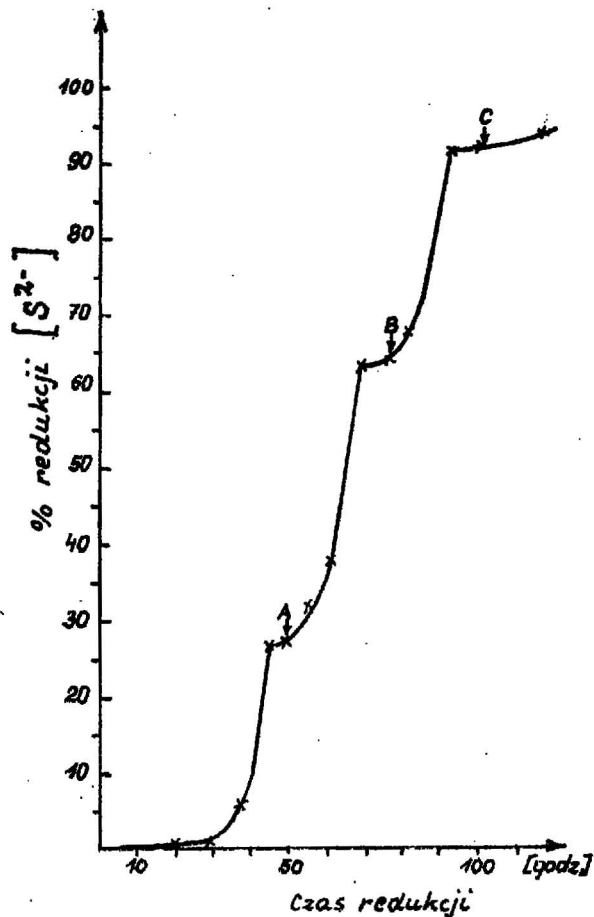


Ryc. 4. Wpływ stężenia NaCl w środowisku reakcyjnym na stopień redukcji gipsu.

a — próba odniesienia, b — 3% roztwór NaCl — 2 ml, c — 3% roztwór NaCl — 4 ml.

Fig. 4. Effect of NaCl concentration in the reaction environment on the degree of gypsum reduction.

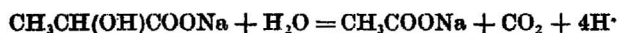
a — reference sample, b — 3% solution of NaCl — 2 ml, c — 3% solution of NaCl — 4 ml,



Ryc. 5. Przebieg mikrobiologicznej redukcji gipsów w roztworze wzbogaconym o mleczan sodu; wprowadzony w ilościach równoważnych 32,0 mg · at C w punktach A, B, C.

Fig. 5. The course of microbiological reduction of gypsum in the solution enriched with sodium lactate; the lactate was introduced in amounts equal 32.0 mg · at C in points A, B, and C.

kich jak: pH środowiska, temperatura i skład chemiczny, z reguły obserwowaliśmy, że proces mikrobiologicznej redukcji siarczanów do siarczków nie zachodził w 100% (porównaj krzywe kinetyczne ryc. 3 i 4). Po okresie indukcyjnym proces osiągał fazę logarytmicznego wzrostu, której towarzyszyło wzmożone wydzielanie się H_2S , a następnie obserwowaliśmy jego gwałtowne zahamowanie. Stwierdziliśmy eksperymentalnie, że przyczyną tego zjawiska jest wyczerpanie się mleczanu sodowego, który jest przyswajalnym źródłem węgla. Przechodzi on bowiem w nieprzyswajalny przez szczep octan sodowy wg reakcji:



Towarzyszy temu zrozumiała zmiana pH środowiska, sięgająca niekiedy do wartości toksycznej (pH=8). Tak więc przyczyn zahamowania procesu należało dopatrywać się zarówno w niedoborze przyswajalnej substancji organicznej, jak i zmianie pH środowiska.

Biorąc pod uwagę uzyskane rezultaty badań, w dalszych doświadczeniach prowadzonych w środowisku o składzie chemicznym podanym w tabeli (doświadczenie 3), w momencie zahamowania procesu redukcji, cofano pH środowiska do wartości 6,7 przez dodanie 0,1% HCl. Pomimo tego nie stwierdzono zmian w przebiegu krzywej. Następnie dodano 1 ml roztworu mleczanu sodowego, zawierającego 32 mg węgla, dopiero wówczas nastąpił gwałtowny wzrost procesu wydzielania się H_2S . Eksperyment ten powtarzano 3-krotnie, a odpowiedni przebieg krzywej kinetycznej zilustrowano na ryc. 5. W pkt A, B, C,

znaczonych na rycinie, wprowadzano każdorazowo 32 mg węgla w formie mleczanu. Ponadto w toku doświadczeń stwierdzono również, że jednorazowe na przykład wprowadzenie 94 mg węgla w postaci mleczanu sodowego na początku procesu (w pkt A) powoduje całkowite zahamowanie redukcji. Sprawa wiąże się prawdopodobnie z przedawkowaniem przyswajalnego źródła węgla oraz naruszeniem określonej równowagi w środowisku reakcyjnym. Tą drogą doszliśmy do przekonania, że mikrobiologiczny proces redukcji gipsów zachodzi przy ciągłym uzupełnianiu substancji organicznych i może przebiegać rytmicznie do końca lub zachodzić tylko częściowo.

W warunkach naturalnych, gdzie nie należy oczekiwać rytmicznego dopływu przyswajalnych związków organicznych, może przebiegać on rytmicznie. Przemawia za tym również warstwowy układ złóż siarki, która w efekcie końcowym powstaje na miejsce gipsu.

W ten sposób wydaje się bezsporny udział bakterii *Desulfovibrio desulfuricans* w pierwszym etapie tworzenia siarczku z gipsu. Przyjęcie tezy o udziale bakterii również w drugim etapie wyjaśniają liczne rozprawy dotyczące tego problemu (1, 6, 9—13). Ponieważ mikrobiologiczna redukcja gipsu zachodzi nadal w zapadlisku podkarpackim, zatem przemawia ona za poglądem o współdziałaniu mikroorganizmów w procesie powstawania złóż siarki.

Wnioski

1. Bakterie *Desulfovibrio desulfuricans*, redukujące siarczany do siarczków, są rozpowszechnione w powierzchniowych i gruntowych wodach złóż gipsowych okolic Karpat.

2. Proces mikrobiologicznej redukcji zachodzi stonkowo intensywnie w wodach solankowych, zawierających około 0,3% wagowych NaCl.

3. Wyizolowane z wód okolic Buska bakterie redukujące siarczany nie wykazują zdolności do utylizacji węgla pochodzącego z propanu, butanu, ropy naftowej oraz nie rozwiązują się w obecności wodoru i w środowisku pozbawionym substancji organicznych. Energia do realizowanego w warunkach laboratoryjnych procesu mikrobiologicznej redukcji czerpiana jest ze związków organicznych zawartych w podłożu gipsowym.

4. Proces mikrobiologicznej redukcji gipsu, prowadzony w warunkach laboratoryjnych, przebiega rytmicznie i wymaga stałego uzupełniania przyswajalnego źródła węgla.

5. Zebrany materiał doświadczalny przemawia za mikrobiologiczną metamorfozą gipsów do wapieni pogipsowych oraz siarkowodoru, który zostaje następnie utleniony do siarki elementarnej.

LITERATURA

1. Czermiński J., Pawłowski S. — Współcześnie zachodzące procesy w złożach siarki i ich znaczenie dla eksploatacji. Prz. geol., 1961, nr 4.

SUMMARY

The conditions of microbial reduction of gypsum (from the area of the Carpathians in Poland) to H_2S , by means of bacteria occurring in sulphur waters of Busko resort, were created in the laboratory. Activity of the bacteria occurring in natural sulphur waters and of isolated *Desulfovibrio* cultures was studied and the character of the effect of some organic compounds, chemical elements, concentration of brines, and other factors on the course of gypsum-reduction process was analysed. The studies confirm the thesis concerning the role of bacteria in the genesis of the Polish sulphur deposits.

2. Domka F., Gąsiorek J. — Aktywność bakterii *Desulfovibrio desulfuricans* występujących w wodach siarkowodorowych okolic Buska. Balneol. pol. (w druku).
3. Domka F., Gąsiorek J. — Investigations on the microbiological reduction of sulphates. Acta microb. pol., nr 4, 1974.
4. Domka F., Marciniak B. — Okres indukcyjny redukcji utleniania jodków za pomocą bromianów. Roczn. chem., 1970, nr 44.
5. Felly H. W., Kulp I. L. — Origin of Gulf Coast salt dome sulphur deposits. Bull. AAPG, 1957, nr 8.
6. Fisher E., Dowgiałło A. — Uwagi o bakteriach siarkowych wód odkrywkowej kopalni siarki w Piasecznie na tle cech środowiska. Przew. 38 Zjazdu Pol. Tow. Geol., 1965.
7. Gąsiorek J., Domka F., Gołębiewska J. — Studia nad mikrobiologiczną redukcją siarczanów. Wiad. chem., 1970, nr 5—6.
8. Ghose T. K. — The influence of short — chain fatty acids, vitamins and some other factors on the sulphate-reduction in lactate cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. Schweiz. Z. für Hydrol., 1955, nr 2.
9. Iwanow M. W. — Primenieniye izotopow dla izucheniya intensiwosti processa redukcii sulfatow w oziere Białowod. Mikrobiol., 1956, nr 3.
10. Iwanow M. W. — Mikrobiologiczeskije issledowanija Prikarpackich siernych miestorożdzenij (cz. 1). Ibidem, 1960, nr 1.
11. Iwanow M. W. — Mikrobiologiczeskije issledowanija Prikarpackich siernych miestorożdzenij (cz. 2). Ibidem, 1960, nr 2.
12. Idanow M. W. — Rol mikroorganizmow w obrazowanii otłożenij siery w sierowodorowych istocznikach Siergiwskich minieralnych wod. Ibidem, 1957, nr 3.
13. Kudrin E. N. — Do hieolohii Rozdolskoho podowiszcza sirki. Hieol. Żurnał, 1957, nr 4.
14. Kurawajko G. T. — Znaczenije biologiczeskogo faktora w okislenii sojedinenij sierg Rozdolskoho miestorożdzenija. Mikrobiol., 1959, nr 6.
15. Patent PRL Nr 149885 (1973). Sposób wytwarzania i regeneracji katalizatorów.
16. Ryżowa W. N., Iwanow M. W. — Mikrobiologiczeskije issledowanija Prikarpackich siernych miestorożdzenij (cz. 6). Mikrobiol., 1961, nr 6.
17. Sokółow A. S. — Osnownyje zakonomiernosti geologiczeskogo strojenija i rozmieszczeniya osadocznych miestorożdzenij samorodnoj siery. Sow. Hieol., 1958, nr 5.
18. Ukłoński A. S., Troickij W. J., Gawriluk M. G. — Gieniezis miestorożdzenij samorodnoj siery i pierspektiwy ich poiskow. Moskwa, 1974.

РЕЗЮМЕ

В лабораторных условиях были проведены опыты восстановления гипсов Предкарпатя с участием бактерий, содержащихся в сернистых водах курорта Буско. Исследовалась активность выделенных колоний бактерий *Desulfovibrio* и роль некоторых органических соединений, концентрации раствора и ряда химических элементов в процессе восстановления. На основании проведенных опытов поддерживается взгляд об участии бактерий в образовании залежей серы на территории Польши.