

Zofia SADECKA

Uniwersytet Zielonogórski, Instytut Inżynierii Środowiska, ul. Z. Szafrana 15
65-516 Zielona Góra, e-mail: z.sadecka@iis.uz.zgora.pl

Biodegradacja malationu w procesie fermentacji metanowej

Proces fermentacji metanowej jest bardzo czuły na wszelkiego rodzaju zmiany środowiska. Wśród związków toksycznie działających na proces należy zwrócić uwagę na pestycydy - chemiczne środki ochrony roślin, które celowo wprowadza się do środowiska w celu zniszczenia pasożytów roślinnych i zwierzęcych. Pozostałości tych ksenobiotyków mogą utrudniać lub hamować procesy stosowane w oczyszczalniach ścieków lub przeróbce osadów ściekowych. W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu malationu - przedstawiciela grupy insektycydów fosforoorganicznych na przebieg procesu fermentacji metanowej. Wpływ malationu na proces fermentacji metanowej, a także jego trwałość i tym samym podatność na rozkład przebadano w zakresie stężeń $0,5\div 3000 \text{ mg/dm}^3$ ($3,2 \cdot 10^{-5}$ do $1,87 \text{ g/g s.m.o.}$). Badania potwierdziły niską trwałość związku w warunkach beztlenowych. Stężenie toksycznie wpływające na przebieg procesu fermentacji metanowej wynosiło $0,32 \text{ g/g s.m.o.}$. Potwierdzają to parametry procesu fermentacji, takie jak: spadek dobowej produkcji biogazu, spadek odczynu, wzrost stężenia lotnych kwasów organicznych oraz skład gazu fermentacyjnego. Wykazano, że procesy degradacji prowadzą do detoksykacji związku, a powstające metabolity przemian nie wykazują wzrostu toksyczności. Stopień rozkładu malationu w warunkach fermentacji metanowej wynosił od 84,2 do 99,9%. W gazie fermentacyjnym stwierdzono od 2 do 2,5% zawartości siarkowodoru, co potwierdza przebieg reakcji biodegradacji malationu w kierunku rozerwania wiązania $P = S$.

Słowa kluczowe: malation, fermentacja metanowa

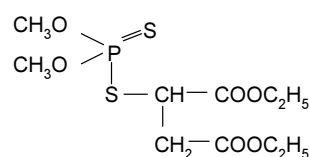
Wstęp

W Europie i w Polsce w chemicznej ochronie upraw stosuje się insektycydy fosforoorganiczne, pyretroidy, karbaminiany i w niewielkim stopniu węglowodory chlorowane. Migracja pestycydów w środowisku i powszechność ich stosowania nie pozostaje bez wpływu na procesy oczyszczania ścieków czy stabilizacji osadów. W literaturze niewiele jest danych na temat występowania pestycydów w ściekach i w osadach ściekowych. Informacje dotyczące biodegradacji pestycydów w środowisku wykazują [1-8], że szczególnie w przypadku persystentnych związków procesy beztlenowe mogą być wydajniejsze w porównaniu z tlenowymi. Tak więc podjęcie tematu zbadania trwałości pestycydów w procesie fermentacji metanowej [5, 9, 10] jest uzasadnione i pozwoli sformułować wnioski o praktycznym znaczeniu w technologii stabilizacji osadów czy też w procesach unieszkodliwiania odpadów niebezpiecznych zawierających wycofane z obiegu czy przeterminowane pestycydy. W badaniach dotyczących wpływu insektycydów na proces

fermentacji metanowej stosowano malation - pochodną ditiofosforanów z grupy insektycydów fosforoorganicznych. Zgodnie z Decyzją Komisji [1] z dnia 6 czerwca 2007 r., dotyczącą niewłączenia malationu do załącznika I do Dyrektywy Rady 91/414/EWG oraz cofnięcia zezwoleń na środki ochrony roślin zawierające tę substancję (notyfikowana jako dokument nr C(2007) 2337), szczególnie ważnym zagadnieniem jest określenie możliwości biodegradacji tego związku w procesach przeróbki osadów prowadzonych w warunkach beztlenowych.

1. Charakterystyka i przemiany malationu w środowisku

Malation jest pochodną kwasu tionotiofosforowego o wzorze sumarycznym $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ i strukturalnym:



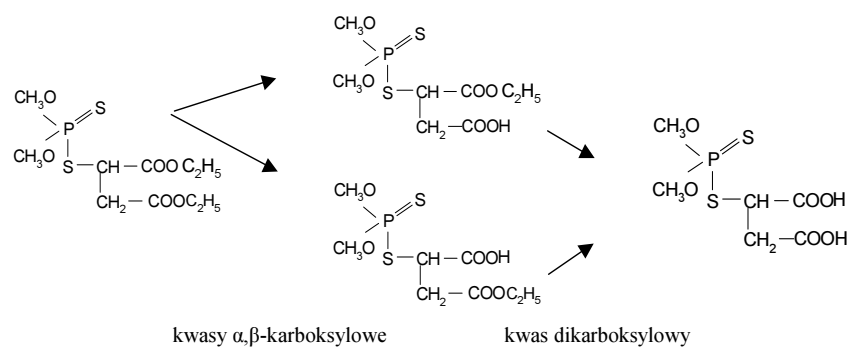
oraz nazwie chemicznej: ditiofosforan O,O-dimetylo-S-1,2 bis-(etoksykarbonylo)-etylu.

Chemicznie czysty malation jest jasnobrązową cieczą o intensywnym, nieprzyjemnym zapachu i temperaturze wrzenia $156\div 170^\circ\text{C}/0,7$ mmHg. Rozpuszczalność w wodzie wynosi $145\text{ mg}/\text{dm}^3$ (25°C), natomiast więcej niż $1\text{ kg}/\text{dm}^3$ rozpuszcza się w acetonie, acetonitrylu, dichloroformie, toluenie; w heptanie rozpuszcza się w ilości $65\div 93\text{ mg}/\text{dm}^3$. Malation jest stosunkowo trwały w obojętnych roztworach wodnych, łatwo natomiast hydrolizuje w środowisku kwaśnym o pH poniżej 5 i środowisku zasadowym o pH powyżej 7 [2, 3]. Jest insektycydem zaliczanym do IV klasy toksyczności. LD_{50} dla szczura (*per os*) wynosi $1375\text{ mg}/\text{kg}$ [4].

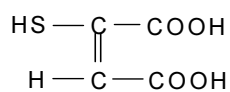
Doniesienia literaturowe [3, 4] wykazują, że w przemianach malationu dominują reakcje hydrolizy estrów karboksylowych, reakcje utleniającej desulfuracji oraz ortodemetylowania. Reakcje hydrolizy wiązań estrowych zachodzą nie tylko w macierzystym związku (rys. 1), ale również w cząsteczce analogu tlenowego. Tworzą się kwasy α - i β -karboksylowe oraz dikarboksylowe. Dalsze ich przemiany polegają na rozerwaniu wiązania *P-S*, co w końcowym efekcie prowadzi do kwasu merkaptamaleinowego (rys. 2).

Takim przemianom podlega malation w środowisku glebowym [4], w którym rozszczepienie wiązania *P-S* prowadzi do produktów końcowych, takich jak kwas merkaptamaleinowy oraz ester dietylowy kwasu maleinowego (rys. 3). Produkty przemian malationu w środowisku w warunkach tlenowych i beztlenowych przedstawiono na rysunku 4.

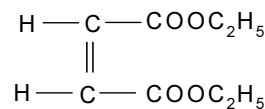
Z literatury wynika, że w przemianach dominują reakcje zachodzące w wiązaniach karboksyloestrowych (produkty I, IV, V, VI, XI, XII), a przemiany (produkty I, IV, XII, IX na rysunku 4) zachodzą tylko w warunkach beztlenowych.



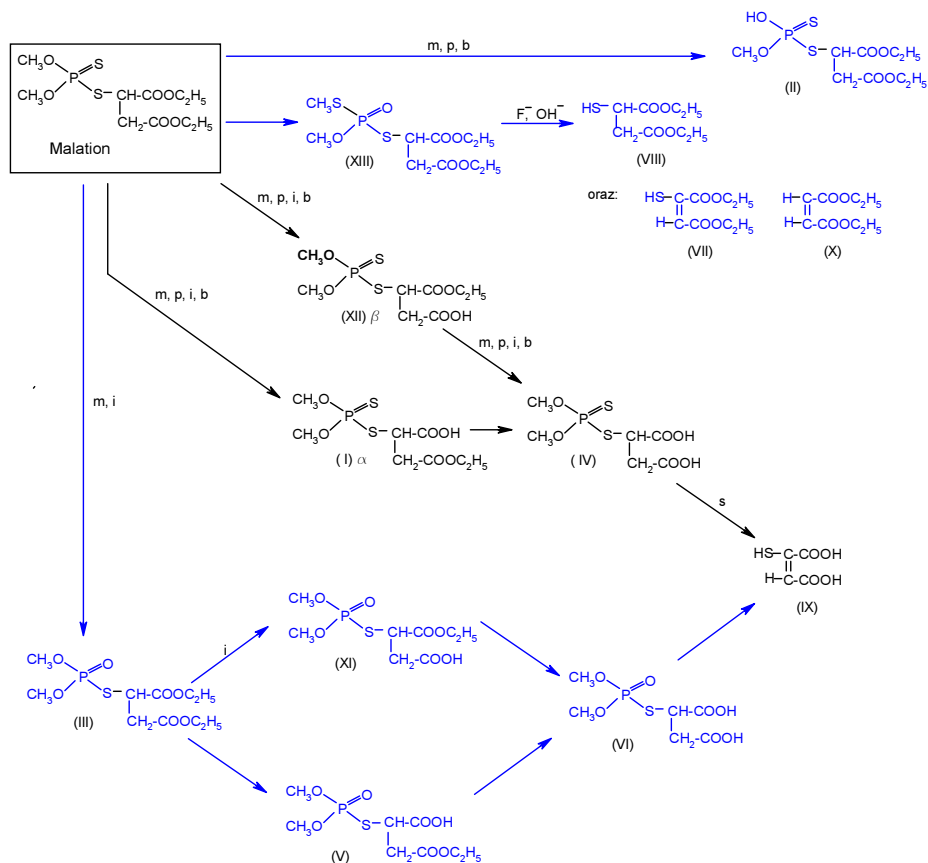
Rys. 1. Reakcje hydrolizy cząsteczki malionu



Rys. 2. Kwas merkaptamaleinowy



Rys. 3. Ester dietylowy kwasu maleinowego



Rys. 4. Transformacje malionu w środowisku [2-5]

2. Cel i zakres badań

Celem badań było wykazanie, czy malation wpływa hamująco na przebieg procesu fermentacji metanowej osadów ściekowych oraz jaka jest biochemiczna trwałość tego związku w warunkach beztlenowych.

3. Charakterystyka substratu

Substratem wejściowym do fermentacji metanowej był osad nadmierny z oczyszczalni ścieków w Świebodzinie. Osad zaszczerpiono w proporcji 3:1 osadem przefermentowanym pobranym z wydzielonych komór fermentacyjnych z oczyszczalni ścieków w Świebodzinie. Mieszanina osadów charakteryzowała się zawartością suchej masy od 50 do 55 g/dm³ (w tym 64÷75% stanowiła sucha masa organiczna) i pH od 6,8 do 7,4. Osady przed wprowadzeniem do laboratoryjnych komór fermentacji cedzono przez sito i dobrze mieszano. Możliwie jednorodną mieszaninę poddawano procesowi fermentacji. Po wpracowaniu komór fermentacyjnych, tj. w 4-6 dobie od zapoczątkowania procesu, dodawano do osadów odpowiednich dawek malationu.

4. Opis stosowanej aparatury, metodyka oznaczeń

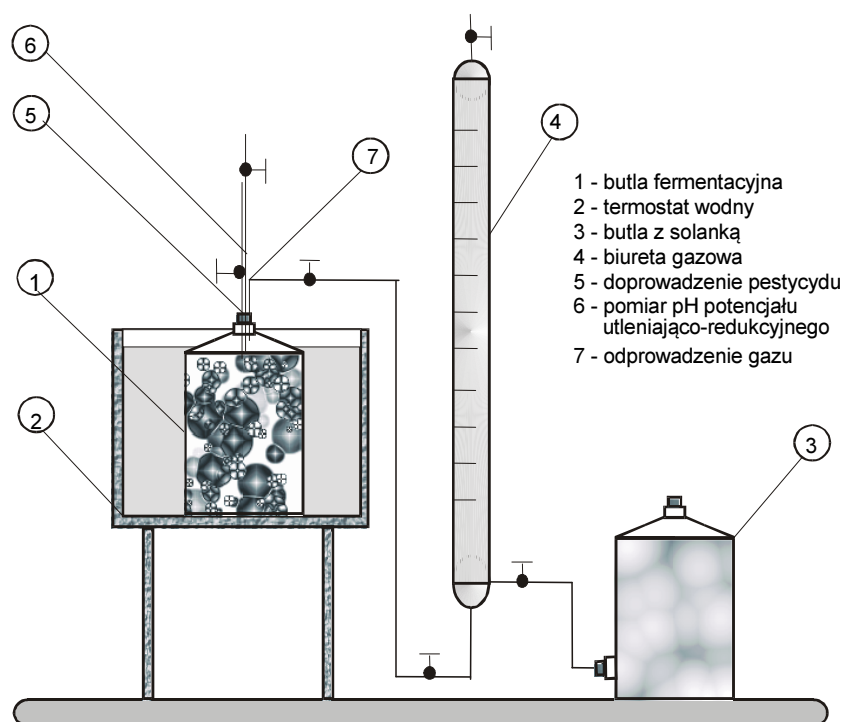
Fermentację metanową osadów ściekowych z badanym pestycydem prowadzono w skali laboratoryjnej metodą periodyczną (układ nieprzepływowy). Komorami fermentacyjnymi były butle szklane o pojemności 3 dm³, umieszczone w 12-stanowiskowym termostacie wodnym. Butle przyłączone były do wyskalowanych biuret gazowych wypełnionych nasyconym roztworem NaCl, które pełniły rolę mierników gazu fermentacyjnego. Poglądowy schemat stanowiska badawczego przedstawia rysunek 5.

Proces fermentacji prowadzono w temperaturze $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Przebieg procesu obserwowano zgodnie z PN-75/0-04616.07 poprzez codzienną kontrolę objętości wydzielonego gazu, temperatury i ciśnienia. Badania rozpoznawcze wykazały, że największą produkcję gazu uzyskiwano w próbach w 4÷6 dobie trwania procesu i dlatego w tym czasie dodawano do osadów odpowiednich dawek malationu.

Dawki podawane są w następujących jednostkach: mg/dm³ oraz g/g s.m.o. - gramy substancji na gram suchej masy organicznej osadu.

W próbkach osadów po fermentacji oprócz ww. oznaczeń badano pozostałości pestycydów w osadach i w cieczy nadosadowej z zastosowaniem ilościowej analizy chromatograficznej. Badania wykonano na chromatografie gazowej z wykorzystaniem detektora TID po sporządzeniu odpowiednich ekstraktów (do ekstrakcji użyto czystego n-heksanu firmy Merck).

Obliczenia wyników analiz przeprowadzono na podstawie danych retencyjnych z analiz próbek i wzorców oraz ilościowej interpretacji według zaadaptowanej normy PN-78/C-04608.



Rys. 5. Schemat stanowiska badawczego

W osadach przed fermentacją oznaczano:

- suchą masę osadów zgodnie z PN-78/ C-04541
- suchą masę organiczną PN-78/ C-04541
- odczyn PN-91/C-04540/05
- kwasy lotne PN-75/C-04616/04

W wytypowanych próbkach określano skład gazu fermentacyjnego metodą chromatografii gazowej, stosując aparat Chrom 5 produkcji CSRL.

Sumy dobowych przyrostów gazu i wydajności gazu zawarte w tabelach i na wykresach odniesione są do warunków normalnych, tzn. $p = 1013 \text{ hPa}$ i $T = 273 \text{ K}$.

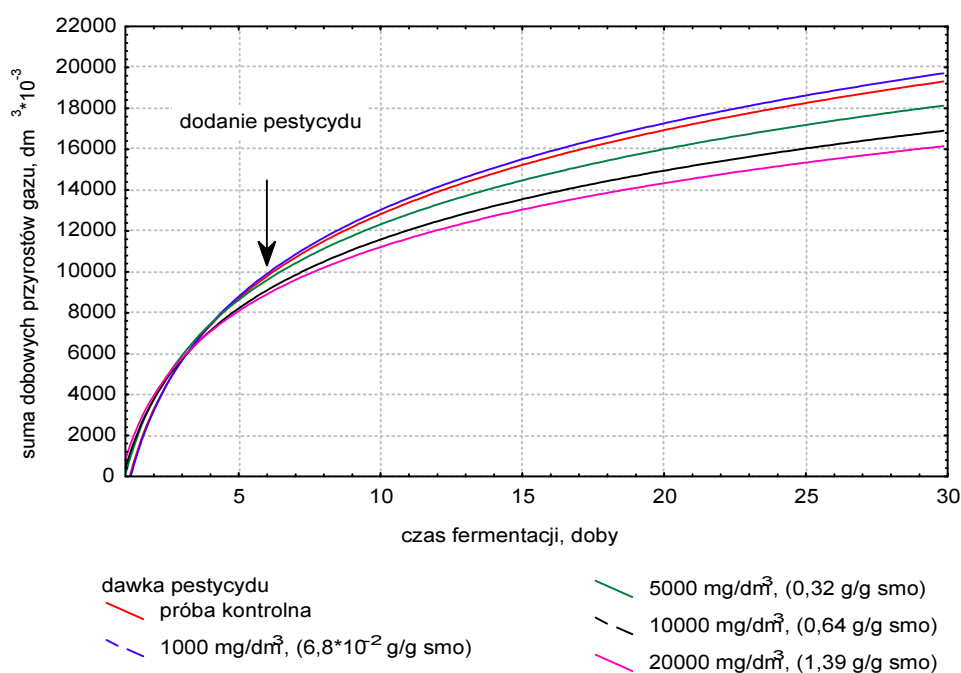
5. Wyniki badań

Wpływ malationu na fermentację metanową osadów ściekowych, a także jego persystencję (trwałość) i tym samym podatność na rozkład w warunkach beztlenowych przebadano w zakresie stężeń od $0,5$ do 3000 mg/dm^3 , co odpowiadało $3,2 \cdot 10^{-5}$ - $1,87 \text{ g/g s.m.o}$. Podstawowe parametry charakteryzujące przebieg procesu fermentacji metanowej zestawiono w tabeli 1.

Stężenia malationu do 1000 mg/dm^3 nie wywoływały negatywnych zmian w przebiegu procesu fermentacji. W próbkach obserwowano nawet stymulację procesu i około 10% zwiększenie produkcji gazu. Wydajności produkcji gazu

oscylowały w granicach wydajności produkcji odnotowanej dla próbki kontrolnej i były w zakresie od 649,7 do 672,9 dm³/kg s.m.o. Na wyrównanym poziomie utrzymywały się też pozostałe parametry określające stabilność fermentacji metanowej, a mianowicie stężenie kwasów lotnych i pH. Wartości tych parametrów były zbliżone do próbki kontrolnej i jedynie w próbce o zawartości 1000 mg/dm³ malationu nastąpił wzrost stężenia kwasów do 274 mg/dm³, co wpłynęło na obniżenie odczynu do 6,94.

Objawy inhibicji procesu wystąpiły w próbce, w której stężenie malationu wynosiło 5000 mg/dm³ (0,32 g/g s.m.o.). Produkcja gazu uległa obniżeniu, co prawda tylko o 17%, ale bardzo znacząco obniżyła się średnia wydajność produkowanego gazu i wynosiła 326 dm³/kg s.m.o., co stanowiło tylko 47% wydajności uzyskiwanej w próbkach przebiegających bez zakłóceń. Zaobserwowano także wzrost stężenia kwasów lotnych do 968,5 mg/dm³ CH₃COOH i obniżenie odczynu do wartości 6,6. Dalsze zwiększanie dawki insektycydu nasilało objawy hamowania procesu. Wydajność gazu obniżała się proporcjonalnie do zwiększającej się dawki malationu. Nasilały się również objawy hamowania procesu z powodu czynników wewnętrznych, np. stężenie kwasów lotnych osiągnęło wartość 1799,7 mg/dm³ przy odczynie 6,3 w próbce o zawartości 30 000 mg/dm³ malationu. Sumę dobowych przyrostów gazu podczas fermentacji osadów z wybranymi dawkami malationu przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 6. Suma dobowych przyrostów gazu podczas fermentacji osadów z zawartością malationu

Tabela 1

Podstawowe parametry charakteryzujące przebieg procesu fermentacji metanowej (dawka malationu od 0,5 do 30 000 mg/dm³)

Zawartość malationu mg/dm ³ g/g s.m.o.	Próbka kontrolna	0,5 3,2 · 10 ⁻⁵	10 6,6 · 10 ⁻⁴	100 6,7 · 10 ⁻³	500 0,036	1000 0,068	5000 0,32	10 000 0,64	15 000 1,05	20 000 1,39	Próbka kontrolna	30 000 1,87
Parametry procesu												
Całkowita produkcja gazu (liczona od wprowadzenia do fermentora pestycydu) dm ³ · 10 ⁻³	9040	10012	9534	9514	8750	9940	7526	7272	7473	6505	8993	5886
Produkcja gazu odniesiona do próbki kontrolnej, %	100	110,7	105,5	105,2	96,8	109,9	83,2	80,4	82,7	72,8	100	65,5
Średnia wydajność gazu dm ³ /kg s.m.o.	672,6	704	690,9	692,8	711,4	649,7	326,5	220,4	181,8	133,8	690,9	162,3
Lotne kwasy organiczne mg/dm ³ CH ₃ COOH	85,71	111,4	111,4	111,4	141,4	274,2	968,5	1307,0	1499,9	1568,4	-	1779,7
pH	7,28	7,10	7,12	7,12	7,04	6,94	6,64	6,46	6,43	6,42		6,36
Malation w cieczy mg/dm ³	-	-	0,1021	0,1421	0,3961	0,6316	134,6154	200,00	250,000	261,598		2078,230
Malation w osadzie mg/dm ³	-	-	0,2631	0,1750	1,7250	0,5250	397,5000	400,00	387,500	362,500	-	2641,86
Σ malationu mg/dm ³	-	-	0,3652	0,3171	2,1211	1,1566	532,1154	600,00	637,50	624,03		4720,093
% usuwania malationu	-	-	96,3	99,7	99,6	99,9	89,4	94,0	95,7	96,08		84,2

Po zakończeniu procesu fermentacji zarówno w cieczy, jak i w osadzie oznaczono zawartość pozostałego malationu. Analiza chromatograficzna wykazała wysoki stopień rozkładu związku, który wynosił $99,9 \div 89,4\%$ (tab. 1). Świadczy to o dużej podatności malationu na proces biodegradacji w warunkach biocenozy bez-tlenowej. Większe pozostałości malationu wykrywane były w osadach niż w cieczy nadosadowej. W gazie fermentacyjnym (tab. 2) stwierdzono od 2 do 2,5% zawartość H_2S w zależności od stężenia dodawanego pestycydu.

Tabela 2

Skład gazu fermentacyjnego - próbki osadów z zawartością malationu

Doba po dodaniu pestycydu	Parametry gazu	Próbka kontrolna	Malation 5000 mg/dm ³	Malation 10 000 mg/dm ³	Malation 15 000 mg/dm ³
3	CH ₄ %	63,74	69,24	53,12	48,53
	CO ₂ %	21,12	16,62	19,83	39,12
	H ₂ %	12,48	9,23	22,41	14,61
	N ₂ %	0,56	1,54	3,25	2,16
	H ₂ S %	0,03	2,20	-	2,25
	wartość opałowa kJ/Nm ³	25 122	28 043	22 139	18 695
8	CH ₄ %	65,26	73,16	56,84	53,08
	CO ₂ %	18,26	17,08	21,16	27,16
	H ₂ %	9,49	5,64	16,06	12,61
	N ₂ %	2,16	1,16	2,18	3,16
	H ₂ S %	0,05	2,08	2,10	2,31
	wartość opałowa kJ/Nm ³	22 984	29 235	24 177	22 169
12	CH ₄ %	61,24	68,26	49,05	45,18
	CO ₂ %	24,16	15,82	24,16	32,56
	H ₂ %	8,51	9,24	23,06	13,64
	N ₂ %	1,83	1,16	2,01	4,18
	H ₂ S %	0,02	2,52	2,02	2,21
	wartość opałowa kJ/Nm ³	24 658	27 273	18 855	17 627
20	CH ₄ %	59,16	nie pobrano próbki do analizy	n.b.	39,18
	CO ₂ %	30,08			37,83
	H ₂ %	7,80			20,06
	N ₂ %	2,60			0,92
	H ₂ S %	-			2,03
	wartość opałowa kJ/Nm ³	23 730			11 972

n.b. - nie badano

Zgodnie z pracami Kroissa i Wabnegga [11], 2,5% udział siarkowodoru w gazie fermentacyjnym w temperaturze 35°C odpowiada stężeniu około 60 mg/dm³ H_2S w roztworze przy 6,5 pH. Stężenie siarkowodoru w cieczy osadowej > 50 mg dm³ wywołuje ponad 40% hamowanie metanogenezy.

Podsumowanie

Przedstawione wyniki badań potwierdzają dużą podatność malationu na biodegradację w warunkach anaerobowych. W całym zakresie stosowanych stężeń (tab. 3) stopień rozkładu był wysoki i wynosił 99,9÷84,2%. Można domniemywać, że rozkład tego związku w warunkach fermentacji metanowej polega na reakcjach hydrolizy grup karboksylowych i dalej poprzez jednoetylowe estry i krótkołańcuchowe kwasy alifatyczne do produktów końcowych: CH₄ i CO₂. Pojawienie się siarkowodoru w gazie fermentacyjnym wskazuje jednak na reakcje, w wyniku których w układzie pojawia się siarka. Tymi reakcjami są przedstawione na rysunku 4 reakcje rozszczepienia wiązania *P-S*. Inhibicyjny wpływ malationu na proces fermentacji metanowej zaobserwowano przy bardzo wysokich stężeniach (0,32 g/g s.m.o.). Tak wysokie stężenia toksyczne potwierdzają, że tworzące się metabolity przemian powodują spadek toksyczności, a więc detoksykację związku.

Tabela 3

Skuteczność usuwania malationu w procesie fermentacji metanowej

Malation		
Zawartość i stężenie początkowe		Stopień usuwania
mg/dm ³	g/g s.m.o.	%
10	$6,6 \cdot 10^{-4}$	96,3
100	$6,7 \cdot 10^{-3}$	99,7
500	$3,6 \cdot 10^{-2}$	99,6
1000	$6,8 \cdot 10^{-2}$	99,9
5000	0,32	89,4
10 000	0,54	94,0
15 000	1,06	95,7
20 000	1,39	96,1
30 000	1,87	84,2

Analiza chromatograficzna pozostałości insektycydów w osadach po procesie fermentacji potwierdziła hipotezę, że pestycydy kumulują się w osadach. We wszystkich próbach stwierdzono, że pozostałości pestycydów po procesie fermentacji występowały w osadach, natomiast tylko niewielkie ilości wykrywano w cieczy nadosadowej.

Pojawianie się siarkowodoru w gazie fermentacyjnym w ilościach proporcjonalnych do stężenia pestycydu powoduje reakcje polegające na rozerwaniu wiązania *P-S*, co w efekcie, zgodnie ze schematem przemian malationu (rys. 4), prowadzi do kwasu merkaptamaleinowego. Uzyskany w badaniach wysoki stopień degradacji w warunkach fermentacji metanowej związku z grupy insektycydów jest naukowym potwierdzeniem przypuszczeń innych autorów [3, 6] co do możliwości rozkładu pestycydów w procesach beztlenowych, a zatem stanowi element nowości w obszarze przemian pestycydów w środowisku.

Literatura

- [1] <http://pl.vlex.com/vid/malationu-dyrektywy-cia-rodki-ochrony-lin-37308135#ixzz1QBdhUJ2J>
- [2] Sadecka Z., Toksyczność i biodegradacja insektycydów w procesie fermentacji metanowej osadów ściekowych, Monografia, Redakcja Wydawnictw Naukowo-Technicznych, Uniwersytet Zielonogórski, Zielona Góra 2002.
- [3] Różański L., Przemiany pestycydów w organizmach żywych i w środowisku, PWRiL, Warszawa 1992.
- [4] White-Stevens R., Pestycydy w środowisku, PWRiL, Warszawa 1977.
- [5] Pesticide Manual, British Crop Protection Council, 9th Ed. 1991.
- [6] Sadecka Z., Podstawy biologicznego oczyszczania ścieków, Wyd. Seidel-Przywecki Sp. z o.o., Warszawa 2010.
- [7] Sadecka Z., Kempa E.S., Toxicity and biodegradation of insecticides in methane sludge digestion, Anaerobic Digestion 2004: 10th World Congress, Montreal 2004, 1, 582-589.
- [8] Sadecka Z., Kempa E.S., The impact of insecticides on anaerobic digestion of wastewater sludge, Resources from Sludge: Forging New Frontiers, Singapore 2004, 8, CD-ROM.
- [9] Sadecka Z., Myszoğraf S., Toksyczność i rozkład fenitrotonu w procesie fermentacji metanowej osadów ściekowych, Ochrona Środowiska 2004, 6, 171-187.
- [10] Sadecka Z., Insektycydy fosforoorganiczne - przemiany w środowisku i wpływ na procesy oczyszczania ścieków i przeróbkę osadów ściekowych, Mat. Konf. Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka, pod red. M. Janosz-Rajczyk, Konferencje 55, Wyd. Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2004, 110-120.
- [11] Kroiss H., Wabnegg F., Das Problem der Sulfatreduktion bei der anaeroben Reinigung sulfatreicher Industrieabwasser, Wiener Mitteilungen WAG, Bd. 62, TU, Wien 1986.

Malathion Biodegradation in Methane Digestion Process

The methane digestion process is very sensitive to all possible variations in its parameters. In the group of compounds exerting a toxic effect on digestion process should pay attention to pesticides - chemical plant protection products, which are intentionally introduce into the environment in order to destroy plant and animal parasites. Residues of these xenobiotics may interfere or inhibit the processes used in sewage treatment plants or sewage sludge treatment. In the article the results of effect of malathion as representative grup of phosphoorganic insecticide on fermentation process are shown. Impact of malathion on methane digestion process and its stability and thus its degradability tested in the range of concentrations $0.5\div 3000\text{ mg/dm}^3$ (from $3.2 \cdot 10^{-5}$ to 1.87 d.m.). The results of the research confirm low persistence of malathion in anaerobic conditions. The toxic concentration influence on methane digestion process was 0.32 d.m. The results confirm also the process parameters such as: decrease in daily production of biogas, decrease in pH, increase of volatile organic acids concentration and fermentation gas compound. Demonstrated that matathion metabolism leads to detoxication of compound and the resulting metabolites do not show increase toxicity. The degree of degradation of malathion in a methane fermentation ranged from 84.2÷99.9%. The concentration of hydrogen sulfide in biogas ranged from 2.0 to 2.5% confirm degradation of malathion of which consist in $P = S$ bond cleavage.

Keywords: malathion, methane digestion process