

Zur Physiologie thermophiler Bacilli

Doctoral Thesis

Author(s):

Baier, Urs

Publication date:

1987

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000490338>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

Diss. ETH Nr. 8423

ZUR PHYSIOLOGIE THERMOPHILER BACILLI

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
URS BAIER ✓
dipl. sc. nat. ETH
geboren am 23. Oktober 1957
von Horgen und Zürich ZH

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. A. Fiechter, Referent
Prof. Dr. G. Hamer, Korreferent

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1987

1. ZUSAMMENFASSUNGEN

1.1. Zusammenfassung

Die Charakterisierung von mehr als 400 thermophilen Organismen aus Klärschlamm beschreibt Bacillus stearothermophilus als in allen Fällen dominanter Organismus bei Temperaturen von 60 °C bis 80 °C. Die Aktivität von thermophilen Pilzen und Actinomyceten kann in diesem Temperaturbereich vernachlässigt werden.

Thermophile Bacillen sind im Abwasser- und Schlammbehandlungsprozess ubiquitär. Die aerob-thermophile Stufe stellt einen Spontanprozess dar, sie benötigt kein spezielles Inokulum und erweist sich als äusserst stabil gegenüber schwankenden Einflüssen. Die Regenerationszeit nach Temperaturzusammenbrüchen oder Unterversorgung mit Sauerstoff liegt im Bereich einer Stunde.

Die thermophil aerobe Mischkultur ist anpassungsfähig in Bezug auf wechselnde Substratzusammensetzung. Eine Zeitspanne von 1-5 h ist ausreichend zur Adaptation an eine breite Palette verschiedener Substrate. Die Zugänglichkeit des Substrates erweist sich als geschwindigkeitsbestimmender Faktor für den Abbau und unterstreicht die Wichtigkeit effizienter Systeme zur Ver- und zur Zerteilung des Substrates. Prozesse mit wesentlich kürzeren Aufenthaltszeiten als sie zurzeit zur Anwendung kommen, liegen aufgrund der in Mischpopulationen gemessenen maximalen spezifischen Wachstumsraten von $\mu_{\max} > 2.1 \text{ h}^{-1}$ durchaus im Bereich des Möglichen. Biomasseausbeuten $Y_{X/S}$ von 0.14 - 0.17 g g⁻¹ führen dabei zu einem erwünschten niedrigen zusätzlichen Schlammanfall.

Der Einsatz eines thermophilen Klärschlamm- oder Abwasserbehandlungsprozesses als Versäuerungsstufe ist nur für kohlehydratreiche Medien realistisch, wobei deren Polymerisationsgrad unwichtig ist.

Die gezeigte obligate Abhängigkeit der Säureproduktion von biologischen oder Prozessparametern betont die Notwendigkeit physiologischer Untersuchungen nicht nur zur Grundlagenforschung sondern ebenso zur Prozessentwicklung. In diesem Rahmen wird die Möglichkeit simultaner Produktion und Assimilation von Essigsäure sowie die einer begrenzten respiratorischen Kapazität der gemischten thermophilen Population diskutiert.

Mit Hilfe thermophiler Mischkulturen wurde im Labormassstab ein Prozess zur Versäuerung stärkehaltigen Abwassers optimiert. Es steht eine leistungsfähige Methode zur Prozessoptimierung zur Verfügung, vorausgesetzt, die zu erreichenden Ziele werden quantifizierbar formuliert.

Physiologische Untersuchungen wurden mit einem aus Klärschlamm isolierten thermophilen Organismus (Bacillus 4100) durchgeführt. Bacillus 4100 ist ein repräsentativer Vertreter innerhalb des sehr schmalen Artenspektrums thermophiler Organismen in Klärschlamm.

Dem unproblematischen und selbststabilisierenden Mischkulturprozess wird ein Reinkulturprozess gegenübergestellt, der anfällig auf wechselnde Umweltbedingungen ist.

Der Einsatz von Bacillus 4100 zur Produktion von Amylase ist nicht kompetitiv angesichts thermostabiler Enzyme, die mit mesophilen Bacillen technisch hergestellt werden. Die obere Temperaturgrenze (84 °C) des produzierten Enzyms ist unabhängig von der Züchtungstemperatur (45 °C - 77 °C). Eine Adaptation an höhere Temperaturen findet nicht statt. Amylaseproduktion ist nicht konstitutiv sondern induzierbar, eine Überproduktion kann mit rein züchterischen Massnahmen jedoch nicht erreicht werden.

Die metabolischen Aktivitäten von Bacillus 4100 (wie Produktion organischer Säuren, Denitrifikation) können zum Auftreten suboptimaler Bedingungen führen und machen die Wichtigkeit einer adäquaten Prozesskontrolle deutlich.

Bacillus 4100 ist genetisch instabil (Plasmidverlust nachgewiesen), was seine Einsatzmöglichkeiten drastisch einschränkt. Methoden zur Kontrolle der Instabilität sind bis anhin keine gefunden worden.

Infolge des ubiquitären Auftretens thermophiler Bacillen ist auch für (extrem) thermophile Reinkultur- und Enzymprozesse eine effiziente Steriltechnik erforderlich.

1.2. Summary

The characterisation of more than 400 thermophilic organisms in sewage sludge showed that Bacillus stearothermophilus was the dominant organism in every case at temperatures between 60 °C and 80 °C. The activity of thermophilic fungi and Actinomycetes can be neglected in this temperature range.

Thermophilic bacilli are ubiquitous in aerobic sewage- and sludge treatment processes. Thermophilic operation occurs spontaneously, requiring no special inoculum preparation and was found to be extremely stable to perturbations. The regeneration time following a collapse in temperature or following oxygen starvation is approximately one hour.

The thermophilic aerobic mixed culture is flexible when subjected to variations in substrate composition. A period of 1-5 h was sufficient for the adaptation to a broad range of different substrates. The susceptibility of substrates to degradation is the rate limiting step in this process and emphasizes the importance of having an efficient system for the dissemination and destruction of substrates.

Application of thermophilic processes to shorter residence time systems than currently practised is possible as a result of the high maximum specific growth rate constant for the mixed culture, $\mu_{\max} > 2.1 \text{ h}^{-1}$. Low biomass yield coefficients, $Y_{X/S}$ between 0.14 and 0.17 g g^{-1} , also result in a minimisation of additional biomass production.

Introduction of thermophilic treatment processes for acidification is only realistic for carbohydrates and the degree of polymerisation is unimportant.

The obligatory dependence of acid production on biological or process parameters demonstrates the need for fundamental physiological investigations as a supporting activity for process development. In this context, the possibilities of simultaneous production and assimilation of acetic acid as well as of a restricted respiratory capacity of the mixed thermophilic population are discussed.

Process optimisation for the treatment of concentrated wastewaters containing starch was investigated at the laboratory scale using a thermophilic mixed culture.

Physiological studies were carried out on a thermophilic organism (Bacillus 4100) isolated from sewage sludge. Bacillus 4100 is a representative member of the small distribution of thermophilic species found in sewage sludge.

In contrast to the easily controllable and self-stabilising mixed culture process, the pure culture system is susceptible to perturbations and needs extensive control.

The application of Bacillus 4100 for the production of amylases is not competitive with respect to thermostable enzymes which are industrially obtained from mesophilic Bacilli. The upper temperature limit (84 °C) for the stability of the enzyme is not dependent on the production temperature (45 °C - 77 °C) and temperature adaptation does not occur. Amylase production is inducible. However, an overproduction could not be achieved simply by varying culture conditions.

Metabolic activity of Bacillus 4100 e.g., organic acid production, denitrification, can lead to suboptimal growth conditions and clearly demonstrates the need for effective process control.

Bacillus 4100 is genetically unstable. The loss of a plasmid has been demonstrated. This drastically limits the potential for its application. No methods to control this instability have yet been found.

As a result of the ubiquitous nature of thermophilic Bacilli, efficient aseptic techniques are essential for extreme thermophilic pure culture and enzyme processes.

1.3. Résumé

La caractérisation de plus de 400 organismes thermophiles isolés à partir des boues de décantation définit Bacillus stearothermophilus comme étant dans tous les cas l'organisme dominant pour des températures de l'ordre de 60 °C à 80 °C. L'activité des champignons et des actinomycètes thermophiles peut être négligée dans ce domaine de température.

Les bacilles thermophiles sont ubiquitaires dans le processus de traitement des eaux de ménage et des boues de décantation. L'étape aérobie-thermophile est un processus spontané qui ne nécessite pas un inoculum spécial et se montre extrêmement stable face à des influences fluctuantes. Le temps de régénérescence après un abaissement de la température ou un apport réduit en oxygène dure environ une heure.

La culture aérobie-thermophile mixte est flexible par rapport à une composition du substrat variable. Un laps de temps de 1 à 5 heures suffit pour l'adaptation à une large palette de différents substrats. L'accessibilité du substrat est le facteur déterminant de la vitesse de décomposition du substrat et souligne l'importance d'un système efficace de distribution du substrat.

Des processus ayant des temps de palier beaucoup plus courts que ceux appliqués actuellement deviennent accessibles grâce au taux de croissance spécifique maximal de $\mu_{\max} > 2.1 \text{ h}^{-1}$ trouvé dans la population mixte. Des rendements de la biomasse $Y_{X/S}$ de 0.14 - 0.17 g g^{-1} donnent, comme désiré, moins de boues résiduelles.

La mise en service d'un processus de traitement thermophile des boues de décantation et des eaux de ménage en tant qu'étape d'acidification n'est sensée que pour des milieux riches en hydrates de carbone dont le degré de polymérisation n'est pas important.

La dépendance démontrée de la production d'acides de paramètres biologiques ou technologiques accentue la nécessité des études non seulement au niveau de la recherche fondamentale, mais aussi au niveau du développement du procédé. Dans ce cadre, les possibilités de production et d'assimilation simultanée d'acide acétique ainsi que de la capacité respiratoire limitée des populations thermophiles mixtes sont discutées.

A l'aide des cultures thermophiles mixtes, un processus d'acidification des eaux de ménage contenant des féculs a été optimisé. Dans la mesure où les objectifs sont quantifiables, on a à disposition une méthode performante pour l'optimisation de procédé.

Des recherches physiologiques ont été conduites avec un organisme thermophile (Bacillus 4100) isolé à partir de boues de décantation. Bacillus 4100 est un membre représentatif à l'intérieur d'un spectre très étroit d'organismes thermophiles des boues de décantation.

Un procédé de culture pure sensible aux influences extérieures et nécessitant de fréquents contrôles a été confronté au procédé standard et autostabilisant de cultures mixtes.

La mise en action de Bacillus 4100 pour la production d'amylase n'est pas compétitive face aux enzymes thermostables extraits des bacilles mésophiles. La limite de température supérieure (84 °C) de l'enzyme produit n'est pas dépendante de la température de culture (45 °C - 77 °C), et une adaptation à la température n'a pas lieu.

La production d'amylase n'est pas constitutive, mais au contraire inductible et une surproduction ne peut pas être atteinte par des moyens de culture uniquement.

Les activités métaboliques de Bacillus 4100 (telles que production d'acides organiques, dénitrification) peuvent mener à des conditions suboptimales montrant l'importance d'un contrôle adéquat du procédé.

Bacillus 4100 est génétiquement instable (perte de plasmide démontré). Des méthodes pour contrôler l'instabilité n'ont pas encore été trouvées jusqu'à présent.

Une technique stérile efficace pour des procédés enzymatiques et de cultures pures thermophiles (extrêmes) est indispensable à cause de la présence ubiquitaire des bacilles thermophiles.

1.4. Riassunto

La caratterizzazione di più di 400 organismi termofili isolati da fanghi di depurazione ha messo in evidenza il Bacillus stearothermophilus come organismo dominante nel raggio di temperatura tra 60 °C e 80 °C. L'attività di funghi e di attinomiceti termofili può essere trascurata in questo spazio di temperatura.

Bacilli termofili sono ubiquitari in ogni fase del trattamento sia dell'acqua di scarico che dei fanghi di depurazione. La fase aero-termofila rappresenta un processo spontaneo che non necessita di alcun inoculo speciale e dimostra d'essere estremamente stabile di fronte ad influssi oscillanti. Il tempo di rigenerazione dopo sbalzi di temperatura o carenza d'ossigeno rientra nello spazio di un'ora.

La coltura mista aero-termofila si adatta facilmente a cambiamenti nella composizione del sostrato. Un periodo da 1-5 ore è sufficiente per l'adattamento ad una vastità di sostrati. L'accessibilità del sostrato è un fattore determinante per la rapidità di decomposizione e sottolinea l'importanza di efficienti sistemi per la dispersione e la dissoluzione del sostrato.

Processi con tempi di permanenza essenzialmente più corti di quelli che vengono adottati oggigiorno sono senz'altro possibili, se si tiene conto di rate specifiche di crescita $\mu_{\max} > 21 \text{ h}^{-1}$. Rendimenti di massa biologica $Y_{X/S}$ di 0.14 - 0.17 g g^{-1} possono anche portare ad un ammassamento di fango inferiore.

L'uso di un processo termofilo per il trattamento di fanghi di depurazione oppure dell'acqua di scarico come fase di acidificazione è realistico solo per sostrati ricchi di idrati di carbonio, il cui grado di polimerizzazione però risulta senza importanza.

La produzione d'acido dipende, come dimostrato, assolutamente da fattori biologici o di processo. Essa accentua la necessità di esami fisiologici non solo al fine di ricerca basilare ma anche per lo sviluppo di processi. In questo quadro viene discussa la possibilità di una simultanea produzione e assimilazione di acido acetico come anche quella di una capacità respiratoria limitata della popolazione termofila mista.

Con l'aiuto di colture termofili miste è stato perfezionato un processo per l'acidificazione di scarichi d'acqua contenente amido. Viene messo a disposizione un metodo efficace per il perfezionamento processuale, ammesso che gli scopi vengano formulati in modo quantificabile.

Ricerche fisiologiche sono state fatte con un organismo termofilo (Bacillus 4100) isolato da fanghi di depurazione. Il Bacillus 4100 è un rappresentante significativo entro lo spettro di specie molto ristretto degli organismi termofili nei fanghi di depurazione.

La coltura mista nonproblematica e autostabilizzante viene paragonata a una coltura pura che esige un controllo e che è soggetta ad influenze esteriori.

L'impiego di Bacillus 4100 per la produzione di amilasi non è competitivo riguardo a enzimi termostabili che vengono ricavati da bacilli mesofili. Il limite superiore della temperatura (84 °C) per l'attività degli enzimi è indipendente dalla temperatura di coltivazione (45 °C - 77 °C); non avviene nessun'adattamento alla temperatura.

La produzione di amilasi non è costitutiva ma inducibile, senza che una sovrapproduzione possa essere ottenuta con sole misure di coltivazione.

Le attività metaboliche di Bacillus 4100 (come produzione di acidi, denitrificazione) possono portare a condizioni inferiori e sottolineano l'importanza di un adeguato controllo del processo.

Bacillus 4100 è geneticamente instabile (perdita di plasmidi dimostrata), limitando drasticamente così il suo impiego. Metodi per il controllo dell'instabilità non sono stati trovati fino ad ora.

Per via della presenza ubiquitaria di bacilli termofili deve essere richiesta, anche per processi termofili, sia di coltura pura che di enzimi, una tecnica efficace di sterilizzazione.