



Synteza i degradacja poli- β -hydroksymaślanu w osadzie czynnym w warunkach tlenowych przy wysokiej koncentracji azotu amonowego w ściekach

Adriana Dobrzyńska, Irena Wojnowska-Baryła, Katarzyna Bernat
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) storage and degradation in activated sludge under aerobic conditions and at high ammonium concentration in wastewater

Summary

Numerous studies confirm poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesis by activated sludge under anoxic/aerobic conditions at high COD/N ratio in wastewater. In the presented experiment poly- β -hydroxybutyrate (PHB) storage and degradation were observed in activated sludge at low COD/N ratio – 3 in wastes. The researches were carried out in a single-stage system with activated sludge under constant oxygen supplied conditions. Readily biodegradable fraction increased in municipal wastewater through the addition of 0,2 g/dm³ acetate. Moreover, ammonium nitrogen was added to the wastes on the level of 50 mgNH₄⁺/dm³.

During the reaction time, organic carbon compounds oxidation by activated sludge and intracellular poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulation were observed. Under aerobic conditions and at low COD/N ratio – 3 in wastewater, activated sludge used accumulated polymer as endogenous carbon source for denitrification. The obtained results show that poly- β -hydroxybutyrate (PHB) synthesis is possible under fully aerobic conditions and at low COD/N ratio.

Adres do korespondencji

Adriana Dobrzyńska,
Katedra Biotechnologii
w Ochronie Środowiska,
Uniwersytet
Warmińsko-Mazurski,
10-719 Olsztyn-Kortowo.

biotechnologia

1 (68) 183–193 2005

Key words:

poly- β -hydroxybutyrate, storage, endogenous denitrification.

1. Wstęp

Poli- β -hydroksymaślan (PHB) należy do grupy polimerów syntetyzowanych przez liczne szczepy bakterii. W badaniach Beacham i wsp. (1) wykazano że spośród 156 wyzolowanych z osadu czynnego szczepów *Acinetobacter* zdolność akumulacji PHB wykazywało 80 szczepów. Daves i wsp. (2) podają, że oprócz *Acinetobacter* PHB kumuluje ponad 20 innych gatunków mikroorganizmów. Są to m.in. szczepy *Aerobacter aerogenes* (3), *Pseudomonas citronellolis*, *Pseudomonas visicularis* i *Escherichia* (5), *Alcaligenes eutrophus* (6), *Azotobacter vinelandii* (7).

Według Carucii i wsp. (8) w systemach z osadem czynnym magazynowanie substancji zapasowych następuje w fazie wzrostu stacjonarnego mikroorganizmów. Ansejo i wsp. (9) podają, że czynnikiem niezbędnym do syntezy kwasu poli- β -hydroksymasłowego jest nadmiar związków organicznych w podłożu. Jednocześnie ogranicza się dostępność związków azotu, siarki czy fosforu lub tlenu w hodowlach tlenowych. Skład pożywki, a głównie rodzaj węgla i azotu mają wpływ na proces syntezy PHB. Carta i wsp. (10) zauważyli, że podczas wzrostu bakterii przy dodatku pirogromianu lub kwasu hydroksymasłowego wzrastała ilość syntetyzowanego PHB, a dodatek octanu zwiększał szybkość syntezy. Wiąże się to z faktem, że związki organiczne w postaci octanu są bezpośrednio przekształcane w acetylo-CoA, a następnie poprzez cykle EMP, HM, ED syntetyzowany jest poli- β -hydroksymaślan. W badaniach prowadzonych przez Majone i wsp. (11) potwierdzono, że magazynowanie PHB jest istotnym mechanizmem usuwania związków organicznych w postaci octanu i etanolu. Acermann i wsp. (12) zastosowali jednocześnie octan i glukozę jako źródła węgla do syntezy polimeru. Uzyskali 80% magazynowanie polimeru w komórkach mikroorganizmów. Yamane i wsp. (13) obserwowali spowolnienie wzrostu bakterii z rodzaju *Alcaligenes* w wyniku ograniczenia ilości tlenu lub azotu w podłożu przy równoczesnym nadmiarze źródła węgla. Takie warunki wzrostu spowodowały zwiększenie ilości syntetyzowanego polimeru do 80% suchej masy.

W warunkach limitowanego stężenia tlenu synteza PHB jest często sprzężona z rozkładem polifosforanów komórkowych (14). Problematyka przemian PHB w procesach biologicznego usuwania związków fosforu ze ścieków jest szeroko opisana w literaturze. Nie do końca natomiast poznany jest natomiast mechanizm wykorzystania tego polimeru w usuwaniu związków azotowych. Majone i wsp. (15) wykazali, że po wyczerpaniu w podłożu związków organicznych donorem elektronów w procesie denitryfikacji staje się endogenne źródło węgla w postaci PHB. W celu zainicjowania procesu syntezy polimeru Majone i wsp. (15) stosowali warunki stresu tlenowego. Autorzy stwierdzili, że w niezrównoważonych warunkach wzrostu magazynowanie było dominującą formą usuwania związków organicznych ze ścieków. Niewiele jest danych o syntezie PHB przez osad czynny przy niskim stosunku ChZT/N w ściekach oraz o wykorzystaniu polimeru w usuwaniu związków azotowych. W osadzie czynnym niskoobciążonym obserwuje się efektywną nitryfikację, natomiast denitryfikacja hamowana jest brakiem donorów elektronów. Z danych li-

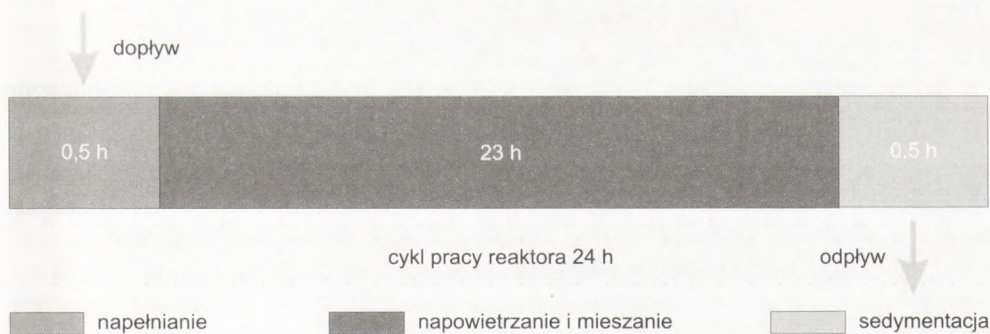
teraturowych wynika, że istnieje możliwość syntezy polimeru przy stosunku ChZT/N wyższym niż 4 (16). Sun i wsp. (17) badali korelację pomiędzy zmagazynowanym wewnątrzkomórkowo polimerem a stosunkiem ChZT/N w podłożu. Stwierdzili, że ilość wytwarzanego PHB rośnie wraz ze wzrostem stosunku ChZT/N. Durner i wsp. (18) badali akumulację polimeru przy zmiennej proporcji ChZT/N w dopływie do reaktora. Hodowlę prowadzili na pożywce zawierającej NH_4^+ jako źródło azotu i octan jako źródło węgla organicznego. W badaniach wykazano, że synteza PHA zachodziła przy stosunku ChZT/N wyższym od 8,3. Akumulacja polimeru zachodziła liniowo, osiągając maksymalną zawartość w komórce (42%) przy stosunku ChZT/N 17,4.

W prezentowanej pracy podjęto badania nad możliwością syntezy PHB przez osad czynny przy stosunku ChZT/N wynoszącym 3. Określono wpływ magazynowania polimeru na efektywność redukcji utlenionych form azotu w warunkach doprowadzania stałej ilości powietrza do reaktora.

2. Medodyka badań

Badania technologiczne prowadzono w skali laboratoryjnej w jednostopniowym układzie osadu czynnego w warunkach stałego doprowadzania powietrza. Do badań wykorzystano reaktor okresowy typu BIOFLO 3000 o pojemności 5 dm^3 . Stężenie osadu czynnego utrzymywano na poziomie $3000 \text{ mg s.m./dm}^3$. Stosowano stały 50% stopień wymiany objętościowej reaktora. Cykl pracy reaktora porcjowego przedstawiono na rysunku 1. Czas reakcji wynosił 23 h.

Ścieki komunalne wzbogacono we frakcję łatwo rozkładalnych związków organicznych poprzez dodanie $0,2 \text{ g/dm}^3$ octanu sodu. W celu uzyskania niskiego stosunku ChZT/N w ściekach doprowadzanych do reaktora dodano $50 \text{ mg N-NH}_4/\text{dm}^3$. Wartości wskaźników zanieczyszczeń w ściekach przedstawiono w tabeli 1.



Rys. 1. Schemat pracy reaktora SBR.

Tabela 1

Charakterystyka ścieków doprowadzanych do reaktora

Wskaźnik zanieczyszczeń	Stężenie w ściekach
związki organiczne	450 mgChZT/dm ³
azot Kjeldahla	120 mgN _{Kjeldahla} /dm ³
azot amonowy	110 mgN-NH ₄ /dm ³

Obciążenie osadu ładunkiem związków organicznych w doświadczeniu wynosiło 0,07 gChZT/g s.m.·d, natomiast ładunkiem związków azotowych 0,04 gN/g s.m.·d.

Po okresie adaptacji osadu czynnego do warunków doświadczenia, kontrolowano zmiany wskaźników zanieczyszczeń w ściekach doprowadzanych i odprowadzanych z reaktora. Wykonywano analizy: związków organicznych (ChZT), azotu amonowego, azotu azotanowego, azotu azotynowego, azotu Kjeldahla, zawiesin ogólnych i organicznych osadu czynnego. Badania wykonywano zgodnie z metodyką podaną przez Hermanowicza i wsp. (19). Zawartość PHB w osadzie czynnym oznaczano metodą spektrofotometryczną według Law i wsp. (20). Pomiar sprawności utleniania związków organicznych wykonano w aparacie OXI TOP. Analizowano kinetykę przemian związków organicznych ChZT oraz PHB.

3. Metody obliczeniowe

Ilość azotu utlenionego obliczono następująco:

$$N - NO_{xt} = N_{Kjeldahladp} - N_{syn} - N_{Kjeldahlaodp}$$

$N - NO_{xt}$	– całkowita ilość azotu utlenionego przez osad czynny	mg N-NO _x /dm ³
$N_{Kjeldahladp}$	– ilość azotu Kjeldahla w ściekach dopływających	mg N _K /dm ³
N_{syn}	– ilość azotu zużytego na proces syntezy w czasie reakcji	mg N _K /dm ³
$N_{Kjeldahlaodp}$	– ilość azotu Kjeldahla w ściekach odpływających	mg N _K /dm ³

Ilość azotu utlenionego, który uległ usunięciu w wyniku denitryfikacji obliczono z następującego wzoru:

$$N - NO_{xzred} = (N - NO_{xt} + NO_{2poz} + NO_{3poz}) - NO_{3odp} - NO_{2odp}$$

$N - NO_{xzred}$	– ilość azotu utlenionego, która uległa redukcji w procesie denitryfikacji	mg N-NO _{xzred} /dm ³
NO_{2poz}	– ilość azotu azotynowego pozostała w reaktorze w czasie t=0h	mg N-NO ₂ /dm ³
NO_{3poz}	– ilość azotu azotanowego pozostała w reaktorze w czasie t=0h	mg N-NO ₃ /dm ³
NO_{2odp}	– ilość azotu azotynowego powstała w reaktorze w czasie t=24h	mg N-NO ₂ /dm ³
NO_{3odp}	– ilość azotu azotanowego powstała w reaktorze w czasie t=24h	mg N-NO ₃ /dm ³

Sprawność nitryfikacji (%) osadu czynnego obliczono wg następującej formuły:

$$\% \text{ nitryfikacji} = \frac{N - \text{NO}_{\text{xt}}}{N_{\text{Kjeldahl dop}}} \cdot 100$$

Sprawność denitryfikacji (%) osadu czynnego obliczono wg następującej formuły:

$$\% \text{ denitryfikacji} = \frac{N - \text{NO}_{\text{xzred}}}{N - \text{NO}_{\text{xt}} + \text{NO}_{2\text{poz}} + \text{NO}_{3\text{poz}}} \cdot 100$$

Sprawność usuwania azotu ze ścieków (%N_{us}) przez osad czynny obliczono wg formuły:

$$\%N_{\text{us}} = \frac{N - \text{NO}_{\text{xzred}} + N_{\text{syn}}}{N_{\text{ogdop}} + \text{NO}_{2\text{poz}} + \text{NO}_{3\text{poz}}}$$

Sprawność usuwania związków organicznych (%C_{us}) obliczono wg formuły:

$$\%C_{\text{us}} = \frac{(C_{\text{dop, ChZT}} + C_{\text{poz, ChZT}}) - C_{\text{odp, ChZT}}}{C_{\text{dop, ChZT}} + C_{\text{poz, ChZT}}}$$

C _{dop, ChZT}	– stężenie związków organicznych w ściekach doprowadzanych do reaktora	mg ChZT/dm ³
C _{poz, ChZT}	– stężenie związków organicznych pozostałych w reaktorze w czasie t = 0h	mg ChZT/dm ³
C _{odp, ChZT}	– stężenie związków organicznych w odpływie z reaktora	mg ChZT/dm ³

Szybkość syntezy i degradacji PHB w osadzie czynnym oszacowano na podstawie zmian ilości polimeru w fazie reakcji.

Procentową zawartość PHB w biomase osadu czynnego obliczono następująco:

$$\% \text{PHB} = \frac{\text{PHB}}{\text{s. m.}} \cdot 100 \quad \% \text{s. m.}$$

Udział poszczególnych frakcji związków węglowych w ściekach obliczono zgodnie z Barnard i wsp. (21).

4. Omówienie i dyskusja wyników badań

Do reaktora doprowadzano ścieki komunalne, o zwiększonej do 30% frakcji związków organicznych bardzo łatwo rozkładalnych. W ściekach dominowała frakcja rozpuszczalna związków organicznych, natomiast frakcja zawiesin stanowiła około 19% związków organicznych ChZT (tab. 2). W wyniku wprowadzenia do ście-

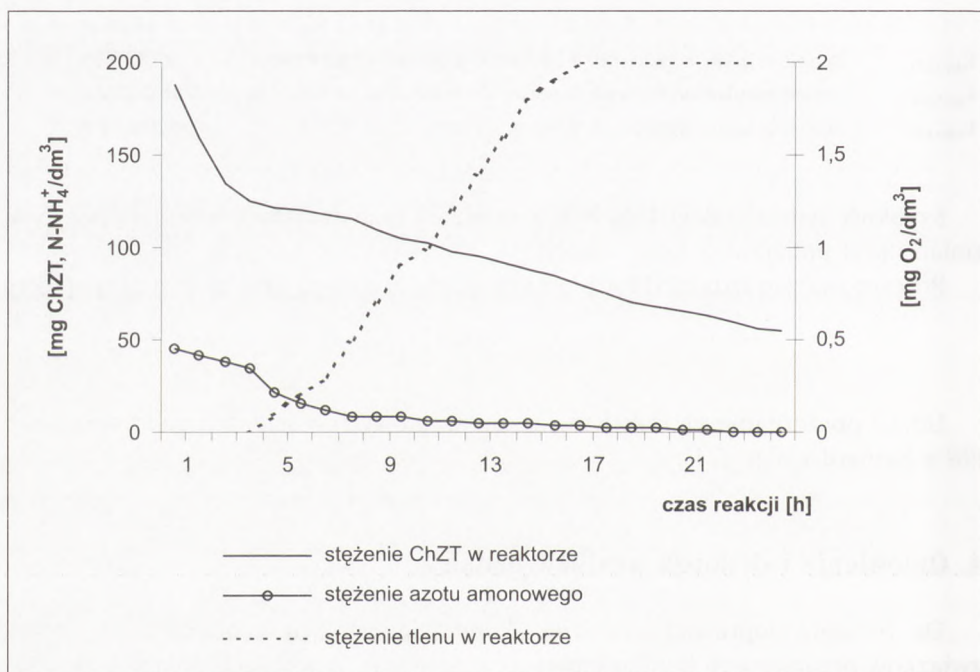
ków komunalnych azotu amonowego w ilości $50 \text{ mgN-NH}_4/\text{dm}^3$ stosunek ChZT/N w ściekach wynosił 3.

Tabela 2

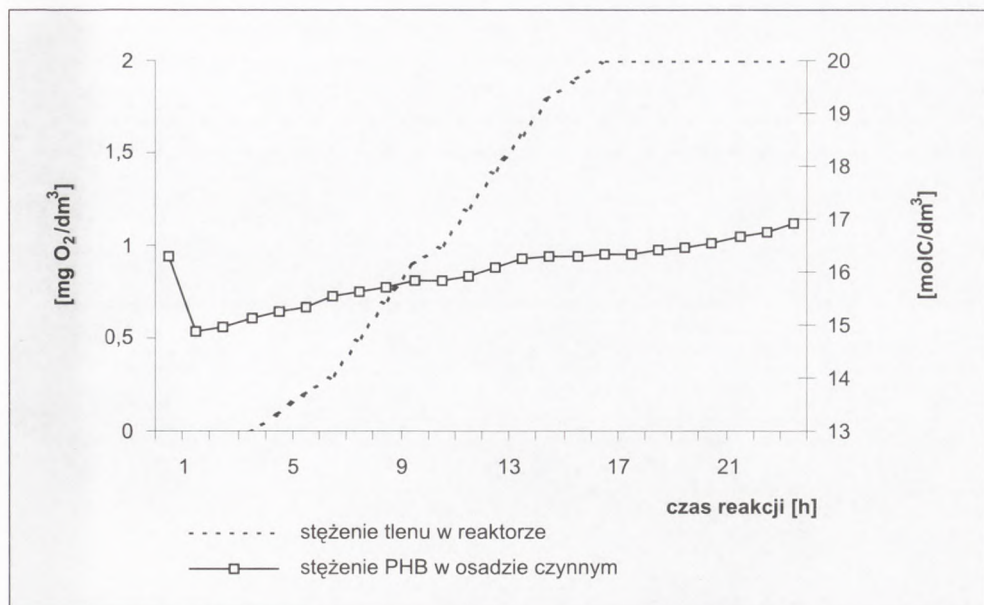
Frakcje związków węglowych w ściekach surowych

Frakcje węgla (ChZT)		Udział procentowy (%)
ChZT rozpuszczone [mg/dm^3]	bardzo łatwo rozkładalne	30
	łatwo rozkładalne	50
	trudno- lub nierozkładalne	1
ChZT w zawiesinie [mg/dm^3]	łatwo rozkładalne	14
	trudno- lub nierozkładalne	5

Od początku fazy reakcji notowano deficyt tlenu rozpuszczonego pomimo doprowadzenia stałej ilości powietrza do reaktora. Tlen zużywany był przez osad czynny w procesach utleniania związków organicznych i amonowych dostarczonych do układu ze ściekami (rys. 2). Przez 4 h fazy reakcji, pomimo stałego napowietrza-



Rys. 2. Zmiany zawartości związków organicznych ChZT, azotu amonowego oraz tlenu w warunkach doprowadzania stałej ilości powietrza do reaktora.

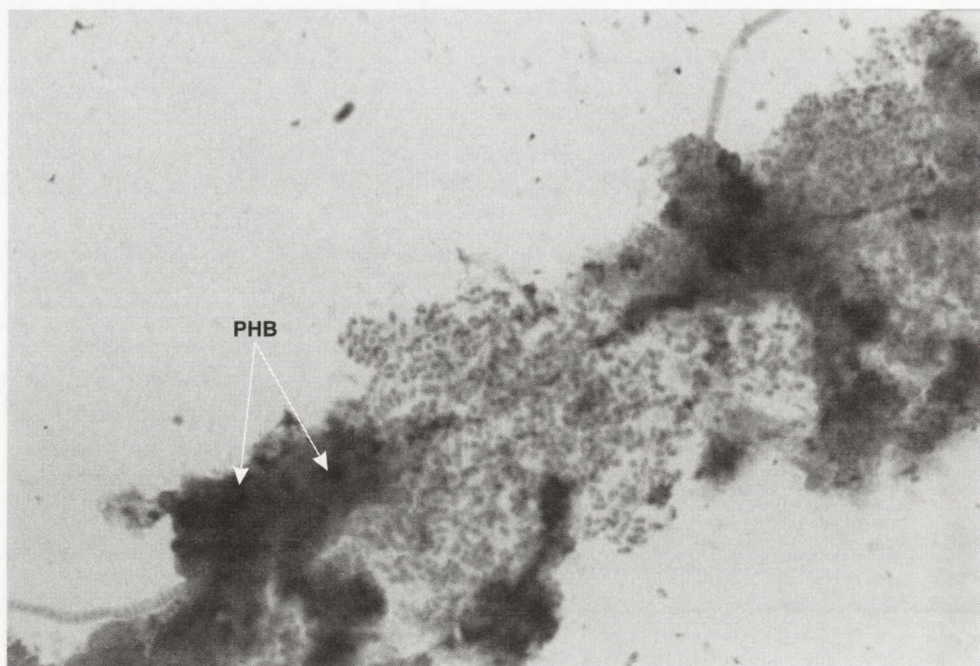


Rys. 3. Zmiany zawartości PHB w osadzie czynnym w fazie reakcji.

nia w reaktorze utrzymywał się deficyt tlenu. Przy szybkości ubywania związków organicznych $ChZT\ 3,6\ mgChZT/dm^3 \cdot h$ obserwowano wzrost stężenia tlenu rozpuszczonego w reaktorze do wartości maksymalnej $2\ mgO_2/dm^3$ w 16 h reakcji.

W warunkach niedotlenienia nie obserwowano syntezy poli- β -hydroksymaślanu w komórkach osadu czynnego. Początek magazynowania polimeru nastąpił w 2 h fazy reakcji (rys. 3). Wzrost stężenia tlenu w reaktorze nie ograniczał syntezy PHB. Buen i wsp. (22) stwierdzili, że zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych przy wieku osadu wynoszącym 8 dni, około 70% ilości octanu zużywana była na syntezę PHB, reszta na przyrost biomasy.

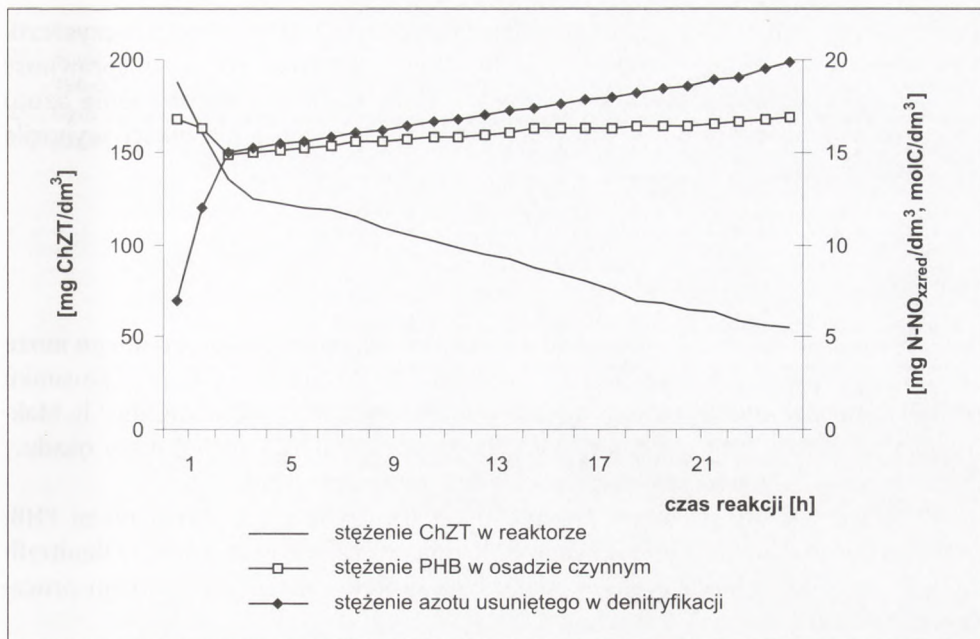
Mikroorganizmy osadu czynnego były zdolne do syntezy polimeru pomimo niskiego stosunku $ChZT/N$ w ściekach (fot. 1). Pod koniec fazy reakcji osiągnięto 12% zmagazynowanego polimeru w komórkach mikroorganizmów. Sun i wsp. (17) wykazali, że wraz ze wzrostem stosunku $ChZT/N$ w środowisku od 6 do 20 rosła ilość wytwarzanego PHB przez *Azospirillum brasilense Sp 7* od 30 do 45% biomasy. W badaniach prowadzonych przez Ugur i wsp. (23) na bakteriach z rodzaju *Streptomyces* dowiedziono, że istotny wpływ na proces magazynowania ma również źródło azotu dominujące w pożywce. Bakterie hodowane na pożywce zawierającej jony amonowe zmagazynowały 0,5% PHB w biomacie, hodowane na glicynie 7,6% PHB w biomacie.



Fot. 1. Osad czynny ze zmagazynowanym kwasem poli- β -hydroksymasłowym (PHB) – metoda wybarwienia czernią sudanu.

Podczas 2 pierwszych godzin pracy reaktora zaobserwowano spadek stężenia związków organicznych wyrażonych jako ChZT z szybkością $16,5 \text{ mgChZT/dm}^3 \cdot \text{h}$ (rys. 4). Nie obserwowano procesu magazynowania poli- β -hydroksymasłanu, ale jego degradację z szybkością $0,93 \text{ molC/dm}^3 \cdot \text{h}$. W tym czasie notowano w osadzie czynnym proces denitryfikacji – ilość usuniętego azotu wyniosła 75,5% ogólnej ilości usuniętych związków azotowych (rys. 4).

Związki organiczne dostarczone do układu ze ściekami były wykorzystywane jako donory elektronów w procesie redukcji utlenionych form azotu. Wykorzystanie związków organicznych na syntezę biomasy i utlenianie komórkowego wynosiło 40% ogólnej ilości usuniętych związków organicznych. Dodatkowym źródłem węgla do denitryfikacji był zmagazynowany wewnątrzkomórkowo poli- β -hydroksymasłan. W badaniach Barak i wsp. (24) dowiedziono, że polimer może być źródłem elektronów w procesie redukcji utlenionych form azotu. Obserwowali oni spadek stężenia azotanów w podłożu przy jednoczesnym spadku ilości PHB w biomacie. Barak i wsp. (24) wykazali, że *Pseudomonas denitrificans* wykorzystuje PHB do redukcji azotanów, a nie do magazynowania polifosforanów. Majone i wsp. (15) dowiedli, że zmagazynowany w fazie endogennej PHB, po wyczerpaniu w podłożu octanu był wykorzystywany jako źródło węgla w procesie denitryfikacji.



Rys. 4. Przebieg denitryfikacji oraz zmiany stężenia ChZT i PHB w fazie reakcji w warunkach stałego doprowadzania powietrza do reaktora.

Carta i wsp. (10) dzielą czas reakcji na dwie fazy: syntezy PHB w warunkach nadmiaru związków organicznych w układzie oraz degradacji PHB w warunkach wyczerpania związków organicznych. W badaniach własnych dowiedziono, że w warunkach wysokiego obciążenia osadu czynnego ładunkiem związków azotowych wynoszącym 0,5 gN/g s.m.:d akumulacja rozpoczynała się od momentu ograniczenia szybkości denitryfikacji (2 h fazy reakcji). Obserwowany wzrost stężenia PHB w komórkach mikroorganizmów następował z szybkością 0,075 molC/dm³·h. Magazynowanie PHB przez osad czynny było notowane, ponieważ w reaktorze nadal były dostępne łatwo i trudno rozkładalne związki organiczne. Szybkość syntezy polimeru przy wysokim obciążeniu osadu czynnego ładunkiem związków azotowych równym 0,04 gN/g s.m.:d jest znacznie niższa niż obserwowana w układach pracujących przy niskim obciążeniu osadu ładunkiem związków azotowych. W układzie pracującym z osadem czynnym, przy zapewnieniu nadmiaru związków węglowych szybkość syntezy polimeru wynosiła 0,29 lub 0,48 molC/dm³·h w zależności od stosowanego źródła węgla (10).

W badaniach własnych obserwowano, że zarówno magazynowanie PHB jak i degradacja przebiegają zgodnie z reakcją zerowego rzędu.

W procesie oczyszczania ścieków przy niskim stosunku ChZT/N oraz w warunkach doprowadzenia stałej ilości powietrza uzyskano 70% redukcję związków orga-

nicznych obecnych w ściekach, co odpowiada stężeniu ChZT w ściekach oczyszczonych na poziomie 55 mgChZT/dm^3 . W tych warunkach technologicznych sprawność usuwania związków azotowych kształtowała się na poziomie 30%, stężenie azotu ogólnego w odpływie wynosiło $10,5 \text{ mgN-N}_{\text{og}}/\text{dm}^3$. Sprawność nitryfikacji wynosiła 85%, a denitryfikacji 33%.

5. Wnioski

1. Synteza poli- β -hydroksymaślanu przez mikroorganizmy osadu czynnego może zachodzić przy niskim stosunku ChZT/N w ściekach. Wyznaczono, że przy stosunku ChZT/N wynoszącym 3 szybkość syntezy polimeru wynosiła $0,075 \text{ molC/dm}^3\cdot\text{h}$. Maksymalna zawartość PHB w komórkach była na poziomie 12% suchej masy osadu.

2. Obecność tlenu w reaktorze nie ogranicza syntezy PHB.

3. Istnieje zależność pomiędzy szybkością denitryfikacji a przemianami PHB. Proces syntezy polimeru obserwowano od momentu zahamowania tempa denitryfikacji. Degradacja poli- β -hydroksymaślanu była skorelowana z intensywnym procesem redukcji utlenionych form azotu.

4. Zmagazynowany wewnątrzkomórkowo poli- β -hydroksymaślan jest źródłem węgla w denitryfikacji endogennej.

Literatura

1. Beacham A. M., Seviour R. J., Lindrea K. C., Livingston I., (1990), *Wat. Res.*, 24, 23-29.
2. Meganck M. T. J., Faup G. M., (1988), *Biotreatment Syst*, 3, Ed. Wise D. L., v. 3. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 111-203.
3. Gersberg R. M., Allen D. W., (1985), *Wat. Sci. Technol.*, 17, 113-118.
4. Choi M. H., Yoon S. C., (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3245-3254.
5. Kato J., Yamada K., Muramatsu A., Hardoyo, Ohtake H., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 3744-3749.
6. Tanaka K., Ishizaki A., Kanamaru T., Kawano T., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 268-275.
7. Page W. J., Knosp O., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 329-333.
8. Carucci A., Dionisi D., Majone M., Rolle E., Smurra P., (2001), *Wat. Res.*, 35, 3833-3844.
9. Asenjo J. A., Schmidt A. S., Andersen P. R., Andrews B. A., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 46, 497-502.
10. Carta F., Beun J. J., van Loosdrecht M. C. M., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 856-871.
11. Majone M., Beccari M., Dionisi D., Levantesi C., Renzi V., (2001), *Wat. Sci. Technol.*, 38, 77.
12. Acermann J., Babel W., (1998), *Polymer Degradation and Stability*, 59, 183-186.
13. Yamane T., Fukunaga M., Lee Y. W., (1996), *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 197-202.
14. Barnard J. L., (1983), *Water Sci. Technol.*, 15, 319-330.
15. Majone M., Massanisso P., Ramadori R., (1998), *Water Sci. Technol.*, 39, 61.
16. Beun J. J., Paletta F., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 67, 379-389.
17. Sun J., Peng X., van Impe J., van Derleyden J., (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 113-117.
18. Durner R., Zinn M., Witholt B., Egli T., (2001), *Biotechnol. Bioeng.*, 72, 278-287.
19. Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Koziarowski B., (1999), *Fizykochemiczne badanie wody i ścieków*, Arkady, Warszawa.
20. Law J. H., Slepecky R. A., (1992), *J. Bacteriol.*, 82, 33-36.

21. Barnard L. L., Oleszkiewicz J. A., (2000), *Materiały seminarium szkoleniowego*, Kraków, 239-248.
22. Beun J. J., Verhoef E. V., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J., (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, 68, 496-507.
23. Ugur A., Sahin N., (2002), *Turk J. Biol.*, 26, 171-174.
24. Barak Y., van Rijn, (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1209-1212.