



Pomiar stężenia biomasy w odpadach i osadach ściekowych

Ewa Liwarska-Bizukojć

Katedra Inżynierii Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Biomass measurement in waste and sewage sludge

Summary

The application of RNA assay and N-acetylglucosamine determination in activated sludge wastewater treatment processes as well as biodegradation of organic solid waste suspension are presented. The conducted experiments proved that both methods can be successfully used for biomass determination in the samples containing much solid particles during waste and wastewater biodegradation. Relative Standard Deviation (RSD) for both measurements are similar and ranged from 0.73 to 4.6%.

Key words:

biomass, indirect methods, biodegradation, RNA, glucosamine.

1. Wstęp

Oznaczanie ilości biomasy można prowadzić w różnorodny sposób, od najprostszych metod wagowych, poprzez oznaczanie zawartości komponentów komórkowych (np. ATP, RNA) aż po identyfikację i liczenie komórek określonej grupy mikroorganizmów z zastosowaniem hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* (FISH) (1,2). Pomimo znaczącego rozwoju metod analitycznych prawidłowe oszacowanie stężenia biomasy stanowi w dalszym ciągu jeden z najważniejszych problemów w dziedzinie modelowania, optymalizacji i kontroli procesów biodegradacji odpadów czy ścieków. Henze i wsp. wskazują jednoznacznie, że brak dostatecznej wiedzy na temat kinetyki wzrostu i wymierania mikroorganizmów jest istotną przeszkodą w uzyskaniu dobrego opisu matematyczno-biologicznego oczyszczania ścieków (3).

Adres do korespondencji

Ewa Liwarska-Bizukojć,
Katedra Inżynierii
Środowiska,
Politechnika Łódzka,
Al. Politechniki 6,
93-590 Łódź;
e-mail:
ewaliwar@p.lodz.pl

biotechnologia

3 (66) 246–253 2004

W pracy tej skoncentrowano się na zastosowaniu metod pośrednich do oznaczania biomasy w procesach biodegradacji ścieków i odpadów. Metody te opierają się na pomiarze komponentów komórkowych takich, jak kwas rybonukleinowy i glukozaamina. Rozpuszczalne kwasy rybonukleinowe (mRNA i tRNA) oraz rybosomy biorą udział w syntezie białek. Stanowią one od 10 do 20% suchej masy bakterii. Natomiast *N*-acetyloglukozoamina jest składnikiem ściany komórkowej mikroorganizmów. Wyniki badań dotyczące zastosowania RNA do oszacowania stężenia biomasy w zawieszynie odpadów były już prezentowane w (4). Oznaczenie GlcNAc było dotychczas wykorzystywane głównie w hodowlach grzybów nitkowatych na podłożu stałym (5,6).

W pracy zostały przedstawione wyniki badań nad zastosowaniem oznaczeń RNA oraz *N*-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) jako wskaźników biomasy w procesach oczyszczania ścieków z udziałem osadu czynnego oraz biodegradacji odpadów. Celem pracy była ocena przydatności obydwu pośrednich metod oznaczania biomasy w biotechnologii środowiska oraz sprawdzenie ich dokładności i powtarzalności.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał badawczy

Do badań posłużyły dwa rodzaje materiału biologicznego. Pierwszym były stałe odpady organiczne z gospodarstw domowych (autochtoniczna mikroflora), w skład których wchodziły głównie obierki z owoców i warzyw. Dokładny skład tych odpadów przedstawiono m.in. w (7). Odpady te były rozdrabniane w ceramicznym młynie kulowym do uzyskania frakcji ziaren o średnicy od 3 do 5 mm. Następnie łączono je z wodą wodociągową i wprowadzano do bioreaktorów z napowietrzaniem.

Drugi z badanych materiałów biologicznych stanowił osad czynny. Osad pobierano z osadnika wtórnego (OWT) w Grupowej Oczyszczalni Ścieków w Łodzi. Zawartość substancji organicznych w zawieszynie (VSS) wynosiła od 5,5 do 5,9 g·l⁻¹, a objętościowy indeks osadu (SVI) wahał się od 108 do 120 ml·g⁻¹ TSS. Podłoże stanowiły ścieki syntetyczne przygotowane wg PN-72/C-04550 (8).

2.2 Warunki prowadzenia badań

Procesy biodegradacji odpadów były prowadzone w bioreaktorach o działaniu okresowym z mechanicznym mieszadłem. Doświadczenia prowadzono w temperaturze 30°C przy zawartości suchej masy (s.m.) od 15 do 66 g·l⁻¹.

Procesy biodegradacji ścieków były prowadzone w termostatowanej łaźni wstrząsanej ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) w kolbach typu Erlenmayera o objętości 300 ml. Eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach. Czas trwania każdego z nich wynosił 12 h.

2.3. Metody analityczne

W trakcie badań prowadzono następujące oznaczenia: zawartości suchej masy (s.m.), suchej masy organicznej (s.m.o.) oraz substancji stałych (TSS) i substancji organicznych (VSS) w zawiesinie metodami wagowymi, RNA metodą KOH/UV (4) oraz glukozyaminy według Nishio i wsp. (9). W celu oznaczenia RNA wymienioną metodą 5 ml świeżo pobranej próby przemywano trzykrotnie 3 ml 0,7 M HClO₄, a następnie dodawano 3 ml 0,3 M KOH i inkubowano przez 60 minut w 37°C. Po odwirowaniu osad był przemywany dwukrotnie 4 ml 0,5 M HClO₄, a następnie łączony z supernatantem. Po usunięciu cząstek stałych mierzono absorbancję przy $\lambda = 260$ nm. Stężenie RNA obliczano wg wzoru podanego przez (10). Natomiast w celu oznaczenia GlcNAc próbę najpierw suszono do stałej masy. Następnie inkubowano w temperaturze otoczenia przez 24 h z 10 ml 12 M HCl, aby przeprowadzić hydrolizę ściany komórkowej. Po odwirowaniu i usunięciu cząstek stałych do 5 ml supernatantu dodawano 2 ml 8,6 M HCl. Roztwór ten poddawano inkubacji w temperaturze 100°C przez 2 h. Po inkubacji analizowaną próbę neutralizowano do pH = 7 i po usunięciu cząstek stałych mierzono absorbancję przy długości fali $\lambda = 530$ nm. Krzywą wzorcową przygotowano na bazie roztworu chlorowodoru glukozyaminy.

3. Wyniki badań i ich omówienie

W pierwszym etapie badań sprawdzono dokładność i powtarzalność oznaczeń RNA i GlcNAc. Okazało się, że obydwa oznaczenia pozwalają na dość dokładne ilościowe oszacowanie biomasy. Względny błąd oznaczenia nie przekracza 5% w przypadku każdego z tych oznaczeń (rys. 1-2). Względne odchylenie standardowe (RSD) dla metody KOH/UV wynosiło 0,7-4% dla zawiesiny odpadów (3 oraz 2,1-4,6% dla osadu czynnego (tab.)). Natomiast w przypadku oznaczenia glukozyaminy RSD mieściło się w przedziale od 2,3 do 4,6% (tab.). Na podstawie obliczonych parametrów statystycznych wykazano, że powtarzalność obydwu oznaczeń jest zadowalająca.

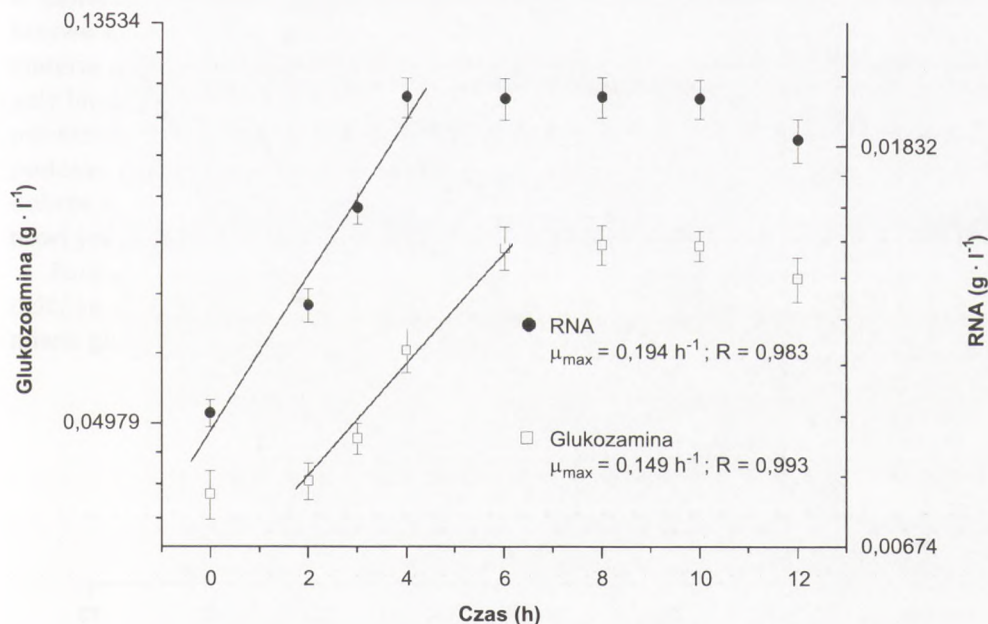
Tabela

Porównanie wartości względnego odchylenia standardowego dla RNA i GlcNAc dla procesu biodegradacji ścieków z udziałem osadu czynnego

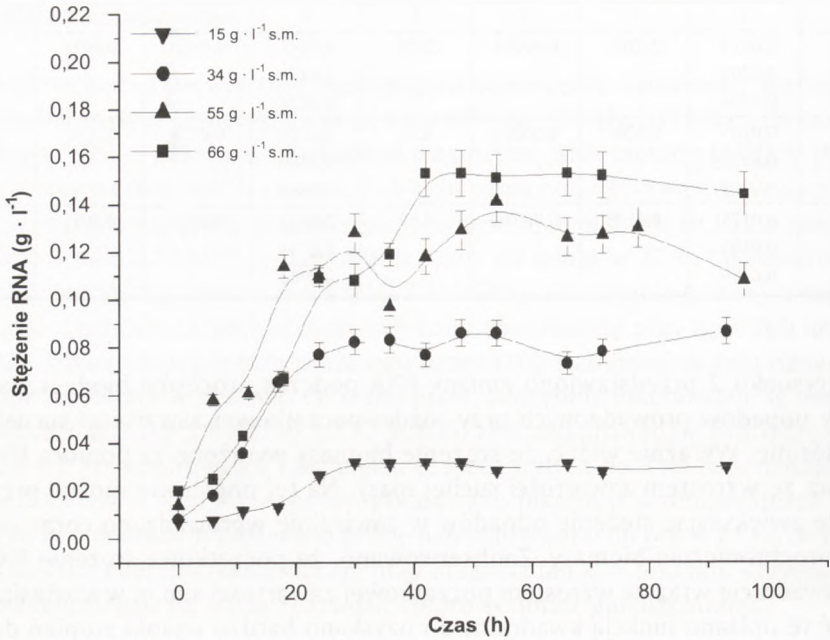
Czas (h)	RNA				Glukozyamina			
	RNA (g·l ⁻¹)	Średnia (g·l ⁻¹)	SD (-)	RSD (%)	GlcNAc (g·l ⁻¹)	Średnia (g·l ⁻¹)	SD (-)	RSD (%)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0,00988 0,0104 0,00969	0,01	0,00037	3,67	0,0399 0,0411 0,0425	0,04218	0,0013	3,11

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	0,0214 0,0202 0,0206	0,0207	0,00061	2,94	0,0493 0,0471 0,0478	0,0480	0,0011	2,34
8	0,0205 0,02075 0,0205	0,0206	0,00014	0,71	0,0739 0,0786 0,0809	0,0778	0,0036	4,58
12	0,0178 0,0195 0,0189	0,0188	0,00086	4,60	0,0731 0,0711 0,0702	0,0715	0,0015	2,07

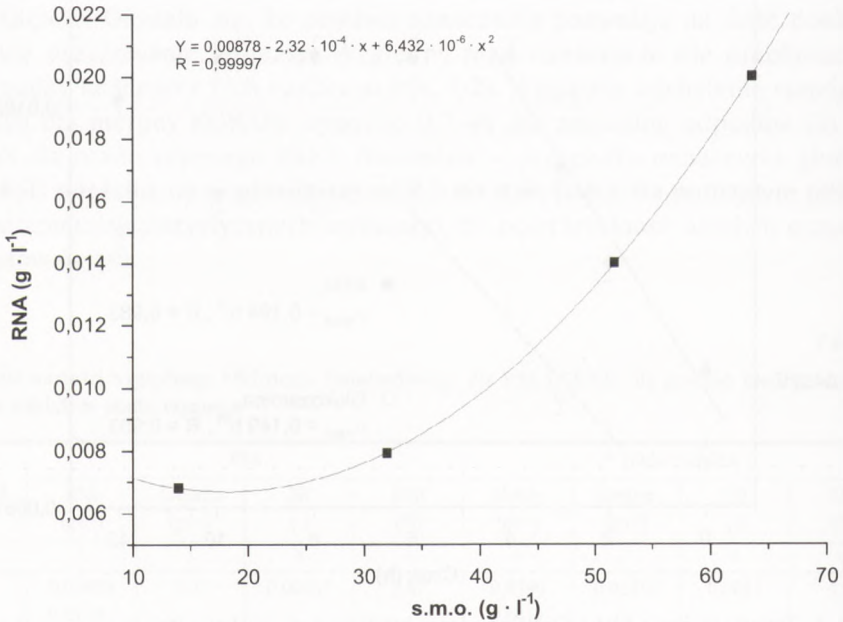
Na rysunku 2 przedstawiono zmiany RNA podczas procesów biodegradacji zawiesiny odpadów prowadzonych przy różnej początkowej zawartości suchej masy w zawieszynie. Wyraźnie widać, że stężenie biomasy wyrażone za pomocą RNA rośnie wraz ze wzrostem zawartości suchej masy. Na tej podstawie można przypuszczać, że zwiększając stężenie odpadów w zawieszynie wprowadzano coraz większą ilość autochtonicznej biomasy. Zaobserwowano, że początkowe stężenie RNA rośnie w kwadracie wraz ze wzrostem początkowej zawartości s.m.o. w zawieszynie. Zależność tę opisano funkcją kwadratową i uzyskano bardzo wysoki stopień dopasowania $R = 0,99997$ (rys. 3).



Rys. 1. Zmiany stężenia RNA i GlcNAc podczas biodegradacji ścieków. Wyznaczenie maksymalnej właściwej szybkości wzrostu biomasy.



Rys. 2. Zmiany stężenia RNA podczas biodegradacji zawiesiny odpadów w bioreaktorze.



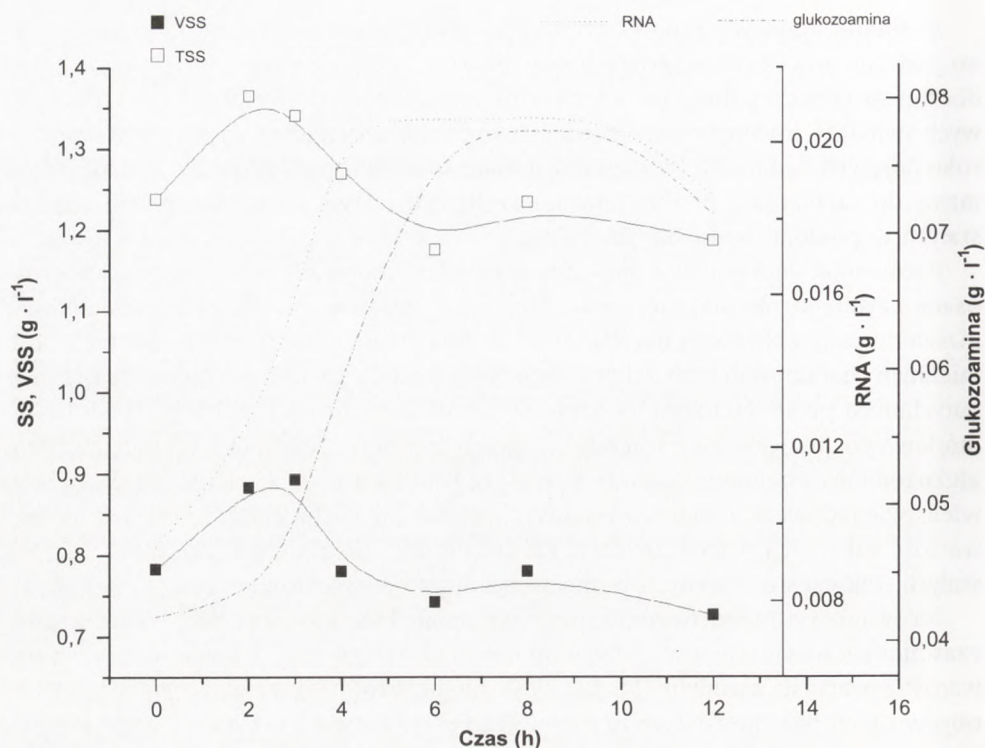
Rys. 3. Zależność pomiędzy początkowym stężeniem RNA a zawartością s.m.o.

Charakter krzywych zmian stężenia RNA oraz glukozoaminy jest podobny zarówno podczas procesu biodegradacji odpadów, jak i ścieków (rys. 1-2). Wyraźnie widoczne są poszczególne fazy wzrostu biomasy. Literaturowy charakter tych krzywych świadczy również o możliwości wykorzystania oznaczeń RNA i GlcNAc w szeroko pojętych badaniach biodegradacji materii organicznej, a zwłaszcza tam, gdzie mamy do czynienia z populacjami mieszanymi i dużym nagromadzeniem cząstek stałych w podłożu hodowlanym

Porównując maksymalne właściwe szybkości wzrostu biomasy wyznaczone dla osadu czynnego okazało się, że wartość μ_{\max} oszacowana dla glukozoaminy jest niższa od μ_{\max} obliczonej dla RNA (rys. 1). Wiąże się to najprawdopodobniej z odmiennym charakterem tych oznaczeń. Według Aiby i wsp. (10) RNA ulega rozpadowi natychmiast po śmierci komórki, stąd oznaczenie zawartości tego komponentu komórkowego pozwala na oszacowanie żywej biomasy. Natomiast pomiar stężenia glukozoaminy obejmuje zarówno żywą, jak i martwą masę komórkową. W przeciwieństwie jednak do oznaczeń wagowych, takich jak sucha masa organiczna czy zawartość substancji organicznych w zawiesinie nie obejmuje organicznych cząstek stałych, tak często obecnych w próbach odpadów i ścieków.

Na rysunku 4 przedstawiono przebieg zmian TSS, VSS oraz RNA i GlcNAc podczas biodegradacji ścieków z udziałem osadu czynnego. Początkowo obserwowano wzrost zawartości zarówno TSS, jak i VSS, ale po około 3-4 h eksperymentu poziom obydwu tych parametrów obniżył się. Wzrost zawartości substancji organicznych w zawiesinie skorelowany jest ze wzrostem wykładniczym biomasy, co pokazują krzywe RNA i GlcNAc. Natomiast późniejszy spadek VSS wskazuje, że nieożywiona materia organiczna, w tym wchodzące w jej skład obumarłe mikroorganizmy, ulegały biodegradacji w kolejnych godzinach trwania doświadczenia. Uzyskane wyniki potwierdzają dotychczasowe doniesienia naukowe mówiące o tym, że pomiar VSS podczas procesów biodegradacji ścieków z udziałem osadu czynnego nie oddaje dobrze zmian stężenia biomasy. Weddle i Jenkins (12) podają, że żywa biomasa stanowi jedynie 10-20% VSS.

Porównując te oznaczenia pod względem techniki laboratoryjnej, należy stwierdzić, że oznaczanie RNA trwa krócej i jest mniej pracochłonne w stosunku do pomiaru glukozoaminy.



Rys. 4. Porównanie zmian RNA glukoaminy oraz TSS i VSS podczas biodegradacji ścieków.

4. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można stwierdzić, że obydwie badane metody pośredniego oznaczania biomasy mogą być stosowane do pomiaru stężenia biomasy w próbach zawierających znaczne ilości cząstek stałych. W przypadku obydwu oznaczeń względne odchylenie standardowe kształtuje się na zbliżonym poziomie i wynosi od 0,73 do 4,6%. Metody te są względem siebie komplementarne i dostarczają odmiennych informacji na temat biomasy. Jednak biorąc pod uwagę prostotę oznaczenia RNA oraz to, że obejmuje tylko żywe komórki, jak się wydaje, jest ono znacznie bardziej przydatnym wskaźnikiem biomasy.

Literatura

1. Cooney C. L., Posten C. H., (1993), *Growth of microorganisms. Biological Fundamentals*, in: *Biotechnology*, vol.1, 2nd ed., H.-J. Rehm & G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
2. Droste R. L., Sanchez W. A., (1983), *Wat. Res.*, 17 (9), 975-983.
3. Henze M., Harremoës P., Jansen J. I. C., Arvin E., (2002), *Wastewater treatment. Biological and chemical processes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

4. Liwarska-Bizukojć E., Ledakowicz S., (2001), *Biotechn. Lett.*, vol. 23, no.13, 1061-1066.
5. Scotti C. T., Vergoignan C., Feron G., Durand A., (2000), *Biochem. Eng. J.*, 7, 1-5.
6. Desgrandes C., Vergoignan C., Georges M., Durand A., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 200-205.
7. Liwarska-Bizukojć E., (2001), *Kinetyka aerobowej biodegradacji zawiesin odpadów organicznych w bioreaktorach*, praca doktorska, PŁ.
8. Polska Norma: Woda i ścieki PN -72/C-04550.
9. Nishio N., Tai K., Nagai S., (1979), *Europ. J. Appl. Biotechnol.*, 8, 263-270.
10. Herbert D., Phipps P. J., Strange R. E., (1971), *Methods in Microbiology*, 5B, 309-344.
11. Aiba S., Humprey A. E., Millis N. F., (1977), *Inżynieria biochemiczna*, WNT, Warszawa.
12. Weddle C. L., Jenkins D., (1971), *Wat. Res.*, 5, 621-640.