



## Rola PHB w przemianach związków azotowych w osadzie czynnym w warunkach tlenowych

Irena Wojnowska-Baryła, Magdalena Zielińska

Zakład Inżynierii Ekologicznej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn

### The role of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in nitrogen compounds reactions in aerobic activated sludge

#### Summary

Efficiency of nitrogen removal by activated sludge at the presence of oxygen was investigated in relation to the retention time (24 h and 12 h) and substrate condition in the reactor. The municipal waste with sodium acetate was used as carbon source. In both presented series the ratio C:N in the reactor was about 6.6:1. The activated sludge loading was 0.08 g/g·d and 0.14 g/g·d; solids retention time was 30.6 d and 13.6 d, respectively. Two fold reduction of retention time causes decrease of the nitrogen removal efficiency. At the solids retention time 30.6 d concentration of PHB was high in opposite to the second series. The nitrogen removal at the low activated sludge loading is possible in the presence of storage material as a carbon source for endogenous denitrification.

#### Key words:

nitrification, denitrification, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, endogenous denitrification, sodium acetate.

#### Adres do korespondencji

Irena Wojnowska-Baryła,  
Zakład Inżynierii  
Ekologicznej,  
Uniwersytet  
Warmińsko-Mazurski,  
10-957 Olsztyn.

## 1. Wstęp

Nitryfikacja jest dwustopniowym procesem utleniania azotu amonowego do azotanów przez autotroficzne i heterotroficzne bakterie tlenowe. Natomiast denitryfikacja jest procesem redukcji azotanów i azotynów, wykorzystującym organiczne związki węglowe jako źródło energii. Denitryfikację prowadzą attotro-

ficzne i heterotroficzne mikroorganizmy zdolne do wykorzystywania utlenionych form azotu, alternatywnych w stosunku do tlenu akceptorów elektronów.

Konieczność intensyfikacji procesów usuwania związków azotowych ze ścieków wymaga stosowania rozwiązań technologicznych zwiększających sprawność biologicznych procesów denitryfikacji. Jednym z takich działań jest wzbogacanie osadu czynnego szczepami bakterii denitryfikacyjnych, których reduktaza azotanowa nie ulega represji tlenem. Denitryfikacja w warunkach tlenowych zależy od występowania szczepów bakterii, u których nie występuje represja enzymów denitryfikacyjnych w obecności tlenu (1). W badaniach Robertsona i in. (2) potwierdzono występowanie denitryfikacji w warunkach tlenowych. Autorzy uzyskali maksymalny stopień denitryfikacji przy 30% nasycenia tlenem w momencie zakończenia nityfikacji. Dabert i in. (3) dokumentują obecność szczepu SGLY2, zdolnego do oddychania azotanowego lub tlenowego w zależności od warunków, w jakich się znajdował. Robertson i Kuenen (4) stwierdzili, że *Thiosphaera pantotropha* wykazywała zdolności denitryfikacyjne nawet przy stężeniu tlenu w środowisku wynoszącym 80%, *Alcaligenes* sp. przy 50% nasycenia, natomiast *Hyphomicrobium* X wymagał warunków niedotlenienia. Autorzy podają, że szybkość denitryfikacji w warunkach tlenowych była znacznie mniejsza. Innym rozwiązaniem technologicznym jest zastosowanie systemów oczyszczania ścieków, w których jednocześnie zachodzi nityfikacja i denitryfikacja. Podstawą symultanicznej nityfikacji i denitryfikacji jest takie dostarczenie tlenu do reaktora, by uzyskać wymagany stopień nityfikacji, jednocześnie na tyle małe, aby w reaktorze występowały strefy niskiego stężenia tlenu rozpuszczonego, niezbędne do denitryfikacji (5). W swoich badaniach Oleszkiewicz (6) potwierdza możliwość uzyskania wysokiej redukcji azotu ogólnego w systemach osadu czynnego ze sterowanym napowietrzaniem odpowiednim do poboru tlenu przez mikroorganizmy. Symultaniczną nityfikację i denitryfikację można prowadzić w porcjowym reaktorze sekwencyjnym SBR, gdzie warunki tlenowe i substratowe zmieniają się w czasie.

Prowadzone są badania nad zapewnieniem w reaktorze warunków do magazynowania przez mikroorganizmy substancji zapasowych, stanowiących źródło węgla w przemianach endogennych. Endogenne źródło energii sprzyja odporności bakterii na stresowe warunki ograniczonego stężenia związków pokarmowych. Istnieją trzy grupy związków będących potencjalnymi rezerwuarami energii u mikroorganizmów: węglowodany (poliglukany, glikogen), lipidy (włączając kwas poli- $\beta$ -hydroksymasłowy) i polifosforany. U cyjanobakterii stwierdzono występowanie azotowych składników zapasowych. Niektóre mikroorganizmy akumulują tylko jeden rodzaj związku zapasowego, inne zdolne są syntetyzować dwa lub więcej, np. *Rhodospirillum rubrum* i *Bacillus megaterium* syntetyzują glikogen i PHB. Kwas poli- $\beta$ -hydroksymasłowy jest liniowym polimerem kwasu D(-)-3-hydroksymasłowego, mającym wysoką masę cząsteczkową. Cząsteczka kwasu jest prawoskrętną helisą z podwójnie skręconą osią. Dawes (7) podaje, że PHB jest idealnym materiałem zapasowym ze względu na zwartą nierozpuszczalną cząsteczkę, wywierającą mało znaczące ciśnienie

nie osmotyczne w komórce. PHB występuje w postaci granuli, zwykle kulistych, otoczonych błoną, posiadającą ściśle przylegający do niej enzym polimerazę PHB. Błony granuli u niektórych bakterii, np. *Rhodospirillum rubrum* i *Azotobacter beijerinckii*, posiadają także depolimerazę PHB, podczas gdy u innych mikroorganizmów depolimeraza jest enzymem rozpuszczalnym.

W niesprzyjających warunkach wzrostu w obecności nadmiaru związków węglowych kwas poli- $\beta$ -hydroksymasłowy akumulowany jest wewnątrzkomórkowo (8). Dawes (7) podaje, że wyjątek stanowią: zmutowana bakteria *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Spirillum* sp., które akumulują znaczne ilości polimeru (12-18% biomasy), rosnąc przy ograniczeniu węgla. Synteza PHB może nastąpić przy ograniczonej ilości w środowisku związków niezbędnych do wzrostu, jak tlen, azot, fosforany, siarczany, magnez, potas, żelazo (9).

W prezentowanej pracy badano zdolność mikroorganizmów osadu czynnego do akumulacji w komórkach kwasu poli- $\beta$ -hydroksymasłowego. Celem badań było określenie efektywności usuwania związków węglowych i azotowych przez osad czynny w warunkach napowietrzania w zależności od czasu zatrzymania ścieków w reaktorze i warunków pokarmowych. Zwiększono dostępność łatwo rozkładalnych związków węglowych w ściekach komunalnych dodając octan sodu. Zakres badań obejmował określenie wpływu ilości związków węglowych w ściekach dopływających do reaktora na przebieg nityfikacji i denityfikacji, wyznaczenie parametrów technologicznych i kinetycznych nityfikacji i denityfikacji w warunkach tlenowych oraz określenie warunków magazynowania w komórkach mikroorganizmów osadu czynnego kwasu poli- $\beta$ -hydroksymasłowego.

## 2. Metodyka

Badania prowadzono w reaktorze okresowym BIOFLO 3000. W warunkach doświadczalnych, w temperaturze 20°C i przy nasyceniu tlenem 30% reaktor o objętości 5 dm<sup>3</sup>, wyposażony w mieszadło (50 obrotów/min), pracował w cyklach dwudziestoczero- i dwunastogodzinnych, podczas których następowały cztery fazy: napełniania (10 min), reakcji – mieszania/napowietrzania (23 h lub 11 h), sedimentacji (30 min) i spustu (20 min). Po 10-dniowym okresie adaptacji mikroorganizmów do warunków eksperymentalnych, w zależności od czasu zatrzymania ścieków w reaktorze, tj. po dwudziestu czterech lub po dwunastu godzinach z reaktora odprowadzano 2,5 dm<sup>3</sup> ścieków oczyszczonych, a następnie doprowadzano 2,5 dm<sup>3</sup> ścieków komunalnych z dodatkiem 1 g octanu sodu. Średni skład ścieków komunalnych wykorzystanych w badaniach przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

## Średni skład ścieków komunalnych

Parametr	Seria I	Seria II
ChZT (mg/dm <sup>3</sup> )	295,7	356,7
N <sub>og</sub> (mg/dm <sup>3</sup> )	40,5	48,7
N-NH <sub>4</sub> (mg/dm <sup>3</sup> )	19,3	18,8

W pracy zaprezentowane zostały wyniki dwóch serii badawczych różniących się czasem zatrzymania w reaktorze. W serii I czas wynosił 24 h, w serii II – 12 h. Wartości pozostałych parametrów technologicznych zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2

## Parametry technologiczne serii badawczych

Parametr	Seria I	Seria II
czas zatrzymania (h)	24	12
stężenie osadu czynnego (mg/dm <sup>3</sup> )	3557,7	2922,5
nasycenie tlenem (%)	30	30
obciążenie osadu ładunkiem związków węglowych (g/g·d)	0,08	0,14
obciążenie osadu ładunkiem związków azotowych (g/g·d)	0,0066	0,0408
wiek osadu czynnego (d)	30,6	13,6
współczynnik przyrostu osadu (g/g)	0,2499	0,5431
C:N	6,774	6,509

Na zakończenie każdej serii badań przeprowadzono badania kinetyczne biodegradacji zanieczyszczeń w ściekach komunalnych z dodatkiem octanu sodu przez osad czynny. Na podstawie uzyskanych wyników zmian zawartości związków azotowych w reaktorze podczas napowietrzania określono szybkość usuwania związków azotowych, wyznaczając rząd i stałą szybkości reakcji.

W ściekach dopływających i odpływających z reaktora kontrolowano wartości następujących wskaźników: stężenie związków organicznych oznaczanych jako ChZT (10), stężenie związków azotowych w formie azotu amonowego (11,12), azotu azotanowego (13) i azotu ogólnego (14) w dopływie, stężenie zawiesin ogólnych, lotnych i mineralnych osadu czynnego (15). Równocześnie kontrolowano zdolność biomasy osadu czynnego do magazynowania substancji organicznych w postaci PHB (metoda wybarwienia podana przez Jenkinsa i in., (16)). Metodą respirometryczną

określono zużycie tlenu przez osad czynny w procesach oddychania endogennego, substratowego i nitryfikacji.

### 3. Omówienie wyników badań

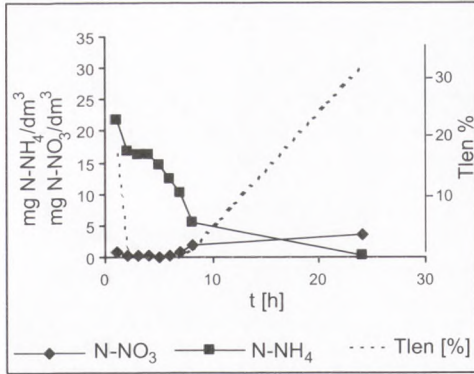
W badaniach przyjęto, że 30% stan nasycenia ścieków tlenem pokrywa zapotrzebowanie mikroorganizmów na utlenianie związków organicznych i azotu amonowego, nie powodując zahamowania denitryfikacji. Zmiana parametrów technologicznych w prezentowanych seriach (tab. 2) nie wpłynęła na sprawność usunięcia związków węgla przez osad czynny (tab. 3). Uzyskano większą sprawność usunięcia związków azotowych przez osad czynny w serii I, w której czas reakcji wynosił 24 h. Szybkości usuwania związków azotu przez osad czynny w obu seriach wynosiły odpowiednio 0,68 mg/g·h i 1,52 mg/g·h.

Tabela 3

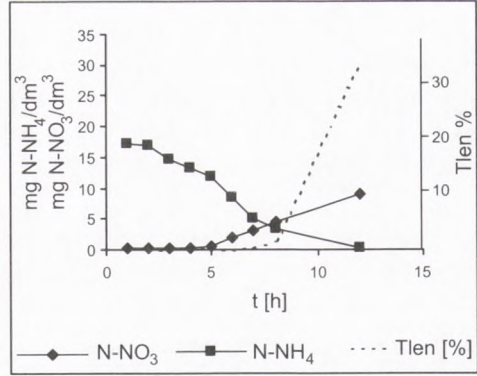
**Efektywność usuwania związków węglowych i azotowych ze ścieków przez osad czynny w warunkach tlenowych**

Parametr	Seria I	Seria II
sprawność usuwania związków węglowych (%)	93,6	90,3
sprawność nitryfikacji (%)	98,4	98,4
sprawność denitryfikacji (%)	84,7	74,0
ChZT w odpływie (mg/dm <sup>3</sup> )	21,3	34,5
N-NH <sub>4</sub> w odpływie (mg/dm <sup>3</sup> )	0,3	0,3
N-NO <sub>3</sub> w odpływie (mg/dm <sup>3</sup> )	5,9	11,1

Wyniki badań kinetycznych biodegradacji ścieków komunalnych potwierdzają zwiększoną sprawność usuwania związków azotu przez osad czynny w serii I. Na rysunku 1 przedstawiono zmiany stężenia azotu amonowego i azotu azotanowego oraz zmiany zawartości tlenu w reaktorze w serii I i II. Z przebiegu krzywych na rysunku 1a wynika, że nitryfikacja i synteza biomasy w serii o dwudziestoczterogodzinnym czasie zatrzymania spowodowały spadek stężenia azotu amonowego z początkowej wartości 21,8 mg/dm<sup>3</sup> do 0,2 mg/dm<sup>3</sup> po 24 h reakcji. Stężenie azotu azotanowego wzrosło z 0,7 mg/dm<sup>3</sup> do 5,1 mg/dm<sup>3</sup>. Stężenie tlenu od drugiej do siódmej godziny wynosiło ok. 0,1%, następnie wzrosło do 30% nasycenia. Z danych przedstawionych na rysunku 1b wynika, że po dwunastu godzinach reakcji stężenie azotu amonowego spadło z początkowej wartości 17,1 mg/dm<sup>3</sup> do 0,3 mg/dm<sup>3</sup>. Zawartość tlenu w reaktorze utrzymywała się na poziomie 0,1-0,3% stanu nasycenia. W ósmej godzinie badań obserwowano wzrost ilości tlenu w reaktorze do 30%. Stężenie azotu azotanowego w reaktorze rosło z wartości początkowej 0,3 mg/dm<sup>3</sup> do 9,1 mg/dm<sup>3</sup> po 12 h reakcji.



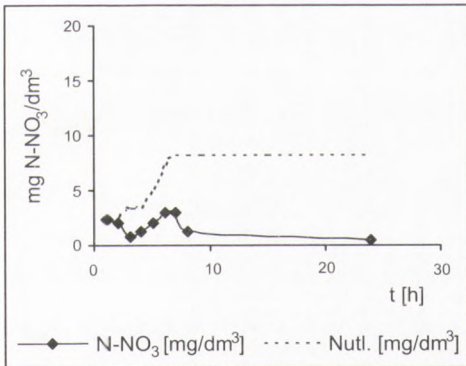
a



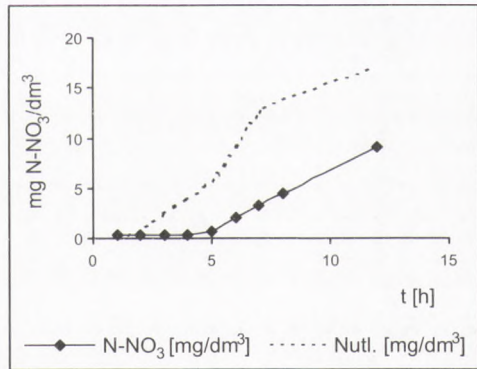
b

Rys. 1. Przemiany związków azotowych w osadzie czynnym w warunkach napowietrzania: a) czas zatrzymania 24 h; b) czas zatrzymania 12 h.

Na podstawie prezentowanych wyników na rysunku 2a i 2b wskazuje się na zachodzenie denitryfikacji w osadzie czynnym w warunkach napowietrzania. Pierwsza krzywa przedstawia uzyskaną zmianę stężenia azotu azotanowego w czasie reakcji, druga teoretyczną wartość azotu utlenionego ( $N_{\text{utl}}$ ), przy założeniu, że całkowita ilość azotu amonowego była utleniona przez osad czynny do azotanów. Różnica stężeń azotu utlenionego i stężenia azotanów w reaktorze wskazuje na przebieg usuwania związków azotowych przez osad czynny. Jest to ta ilość związków azotowych, która została usunięta przez osad czynny w wyniku denitryfikacji i syntezy biomasy. Ze względu na niski współczynnik przyrostu osadu (0,2499 g/g i 0,5431 g/g) ilość związków azotowych wykorzystanych na syntezę biomasy była niewielka.

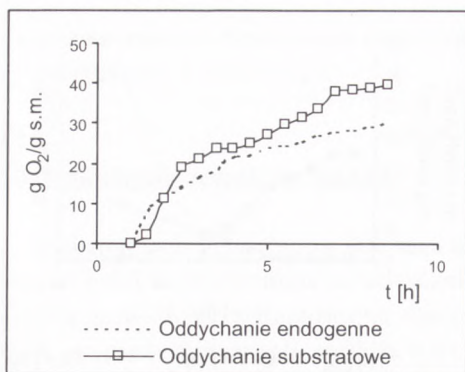


a

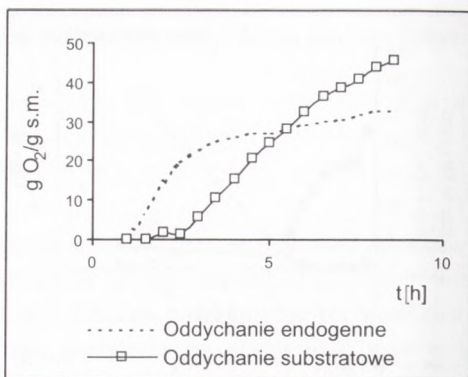


b

Rys. 2. Przebieg usuwania związków azotowych przez osad czynny w warunkach napowietrzania: a) czas zatrzymania 24 h; b) czas zatrzymania 12 h.



a



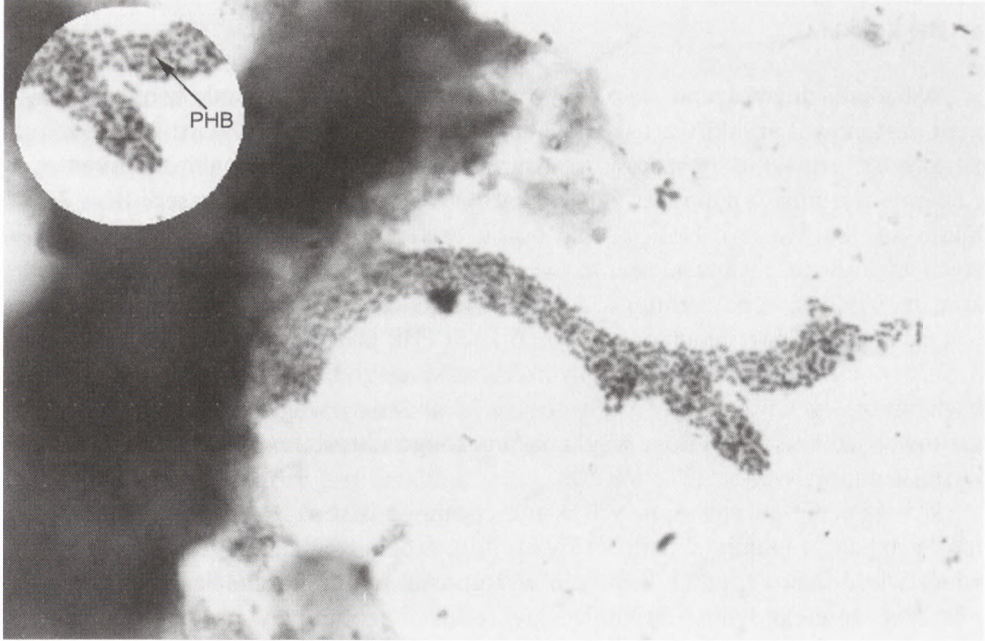
b

Rys. 3. Oddychanie endogenne i substratowe osadu czynnego: a) czas zatrzymania 24 h; b) czas zatrzymania 12 h.

Na rysunku 3a i 3b przedstawiono przebieg oddychania endogennego i substratowego osadu czynnego w omawianych seriach. Na początku cyklu tlen był zużywany przede wszystkim na oddychanie endogenne.

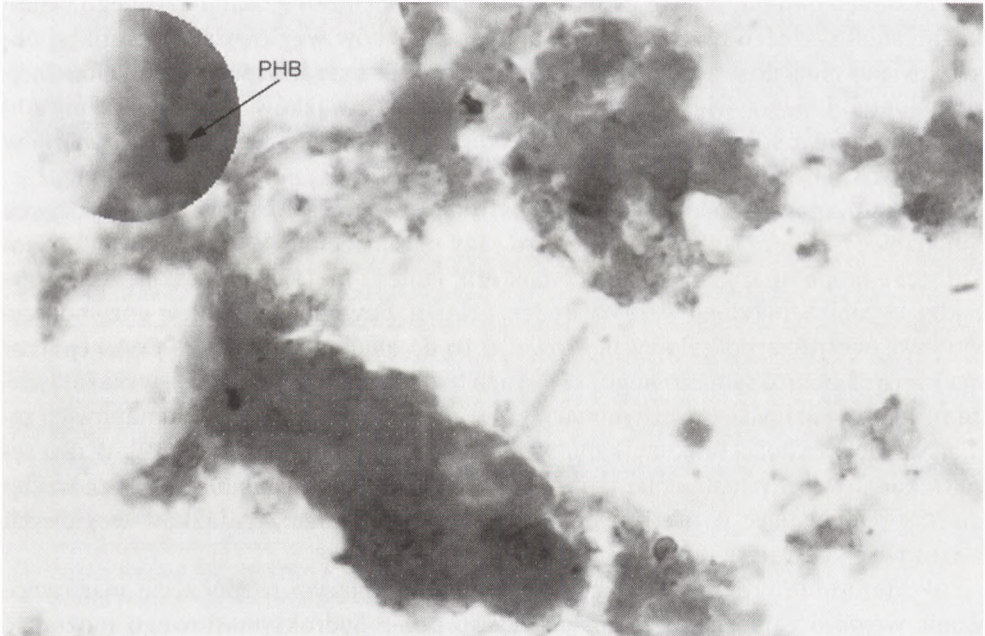
W badaniach mikroskopowych osadu czynnego dowiedziono, że przy wieku osadu wynoszącym 30,6 d i czasie zatrzymania ścieków w reaktorze 24 h koncentracja kwasu poli- $\beta$ -hydroksymasłowego była wysoka, uległa natomiast znacznemu obniżeniu przy 13,6-dniowym wieku osadu czynnego i 12 h czasie zatrzymania. Fotografie osadu czynnego ze zmagazynowanym kwasem PHB (wybarwiony na czarno) w obu seriach przedstawiono na rysunku 4a i 4b.

Rys. 4. Fotografie osadu czynnego z wykształconym kwasem PHB: a) czas zatrzymania 24 h; b) czas zatrzymania 12 h.



a

b





#### 4. Dyskusja

W badaniach wykazano, że po zakończeniu procesów utleniania w osadzie czynnym następował szybki wzrost stężenia tlenu w reaktorze do wartości nasycenia. Sprawność usuwania związków azotowych ze ścieków komunalnych przez osad czynny w warunkach napowietrzania wynosiła w serii I – 84,7%, a w serii II – 74,0%. Mimo niskiego w serii I obciążenia osadu czynnego ładunkiem związków węglowych, efektywność usuwania azotu była wyższa niż w serii II. Wynikało to z dłuższej fazy denitryfikacji endogennej w serii I. W fazie denitryfikacji endogennej bakterie wykorzystywały nagromadzony w komórkach PHB jako donor elektronów w obecności azotanów. Polimer kwasu 3-hydroksymasłowego bakterie produkują w warunkach limitujących wzrost, jednak w obecności nadmiaru węgla organicznego. W prezentowanych badaniach ilość węgla organicznego określono stosunkiem C:N, który wynosił odpowiednio 6,774 i 6,509.

W badaniach mikroskopowych osadu czynnego w serii II zaobserwowano w komórkach bakterii minimalne ilości kwasu PHB, źródła węgla endogennego, w przeciwieństwie do serii I, gdzie kwas ten występował w dużych ilościach. Można przypuszczać, że efektywność dysymilacyjnej redukcji azotanów w osadzie czynnym zależała od rezerwy węgla organicznego zgromadzonego w komórkach bakterii. Na podstawie wyników badań własnych wskazuje się, że mniejsze zużycie związków węglowych w procesach denitryfikacji pozwoliło na zgromadzenie większej ilości kwasu PHB w komórkach osadu czynnego w serii I i zapewniło efektywną denitryfikację endogenną. W serii II w reaktorze panowały warunki sprzyjające syntezie PHB: niskie stężenie tlenu, prawie dwukrotnie wyższe obciążenie osadu czynnego ładunkiem zanieczyszczeń organicznych (nadmiar związków węglowych). W serii tej obserwowano małą ilość kwasu PHB w komórkach mikroorganizmów. Wynikało to najprawdopodobniej z większej szybkości usuwania związków azotu (1,52 mg/g·h) w porównaniu z serią I (0,68 mg/g·h), a tym samym z większego zużycia związków węglowych na denitryfikację.

W szczegółowych badaniach bakterii *Azotobacter beijerinckii* rosnącej na pożywce glukozowej Dawes (7) dowiódł, że tylko przy ograniczeniu tlenu uzyskiwano wysokie stężenie polimeru w komórkach bakterii. James i in. (17) stwierdzili, że w przypadku ograniczenia tlenu wzrasta stężenie NADH, powodując inhibicję enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych. Prowadzi to do akumulacji acetylo-CoA i tworzenia kwasu 3-hydroksymasłowego. W swoich badaniach Chen i in., (18), wskazują także na zależność ilości zmagazynowanego w komórkach kwasu PHB od napowietrzania. Największe ilości PHB uzyskano przy stężeniu tlenu poniżej 6,9% (19). W obu seriach badań własnych stężenie tlenu przez 8 godzin było niskie (0,0-1,5%) ze względu na przebiegające w osadzie czynnym procesy utleniania związków węglowych i azotowych zawartych w ściekach.

W literaturze wykazuje się, że czynnikiem hamującym rozpoczęcie magazynowania węgla organicznego w postaci kwasu poli- $\beta$ -hydroksymasłowego może być

czas zatrzymania ścieków w reaktorze. Według Martineza i in. (20), bakterie rosnące na pożywce z 2% sacharozy wytworzyły 0,119 mg PHB/ml (czas 24 h) i 0,136 mg PHB/ml (czas 48 h). Według Hallina i in. (21) nawet, wtedy gdy do ścieków dodawane są łatwo rozkładalne związki, jak octan, potrzebny jest czas adaptacji mikroorganizmów do zmienionych warunków pokarmowych. W obu seriach proces utleniania substratów zawartych w ściekach był poprzedzony okresem, kiedy bakterie wykorzystywały głównie wewnątrzkomórkowe substancje zapasowe, przechodząc z fazy oddychania endogennego do fazy utleniania. Istnieją jednak dane (22), wskazujące, że produkcja polimeru była niezależna od ograniczenia istotnego składnika pokarmowego.

Na podstawie wyników badań własnych wskazuje się, że usuwanie związków azotowych przy niskim obciążeniu osadu czynnego ładunkiem zanieczyszczeń jest możliwe, gdy są zapewnione warunki do wytworzenia materiału zapasowego w postaci polimeru PHB, który jest źródłem węgla w denitryfikacji endogennej. W prezentowanych badaniach do takich czynników można zaliczyć występowanie w ściekach frakcji łatwo rozkładalnej, wzbogaconej dodanym do ścieków octanem oraz okresowy deficyt tlenu w reaktorze.

## Literatura

1. Kuenen J. G., Robertson L. A., (1994), *Proceedings of the 6<sup>th</sup> European Congress on Biotechnology*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 235-240.
2. Robertson L. A., Niel E. W. J., Torremans R. A. M., Kuenen J. G., (1988), *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2812-2818.
3. Dabert P., Patureau D., Godon J. J., Bouchez T., Zumstein E., Moletta R., (1997), *Environmental Biotechnology*, 1, 193-196.
4. Robertson L. A., Kuenen J.G., (1992), *Microbial control of pollution*, Cambridge University Press, 227-267.
5. Watanabe Y., Okabe S., Hirata K., Masuda S., (1995), *Water Science Technology*, 31, 195-203.
6. Oleszkiewicz J. A., (1997), *Biologiczne usuwanie azotu*. Materiały Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Technicznej, Kraków.
7. Dawes E. A., (1986), *Microbial energetics*, Chapman and Hall, New York.
8. Choi J., Lee S. Y., (1999), *Biotechnology and Bioengineering*, 62, 546-553.
9. Asenjo J. A., Schmidt A. S., Andersen P. R., Andrews B. A., (1995), *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 497-502.
10. Polska Norma 74/C-04578/03 – Oznaczanie chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT) metodą dwuchromianową.
11. Polska Norma 73/C-04576/01 – Oznaczanie azotu amonowego metodą kolorymetryczną z odczynnikiem Nesslera.
12. Polska Norma 73/C-04576/02 – Oznaczanie azotu amonowego metodą miareczkową.
13. Polska Norma 73/C-04576/08 – Oznaczanie azotu azotanowego metodą kolorymetryczną z kwasem fenolodwusulfonowym.
14. Polska Norma 73/C-04576/12 – Oznaczanie azotu ogólnego Kjeldahla.
15. Polska Norma 72/C-04559/02 – Oznaczanie zawiesin ogólnych, mineralnych i lotnych metodą wagową.

16. Jenkins D., Richard M. G., Daigger G., (1986), *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*, Water Research Commission, Pretoria, 30.
17. James B. W., Mauchline W. S., Dennis P. J., Keevil C. W., Wait R., (1999), *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 822-827.
18. Chen G., Page W. J., Chen G. Q., (1997), *Biotechnology Techniques*, 11, 347-350.
19. Tanaka K., Ishizaki A., Kanamaru T., Kawano T., (1995), *Biotechnology and Bioengineering*, 45, 268-275.
20. Martinez P., Guzman J., Espin G., (1997), *Biotechnology Letters*, 19, 909-911.
21. Hallin S., Rothman M., Pell M., (1996), *Water Research*, 30, 1445-1450.
22. Martinez-Toledo M. V., Gonzalez-Lopez J., Rodelas B., Pozo C., Salmeron V., (1995), *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 413-418.