

Denitryfikacja w bioreaktorze typu MEANDER z udziałem *Thiobacillus denitrificans*

Ryszard Pado¹

Lucyna Pawłowska-Ćwięk¹

Krystyna Starzyk²

Grzegorz Kreiner¹

¹ Zakład Mikrobiologii Wyższa Szkoła Pedagogiczna
Kraków

² Oczyszczalnia Ścieków Komunalnych
Kraków-Płaszów

1. Wstęp

Ścieki komunalne odprowadzane do wód powierzchniowych zawierają znaczne ilości azotanów. Najwłaściwszym sposobem ich oczyszczania jest coraz powszechniej wdrażana metoda biologiczna z zastosowaniem osadu czynnego w tzw. bioreaktorach. Najbardziej pożądanymi procesami w biologicznym oczyszczaniu ścieków komunalnych są procesy denitryfikacji prowadzące do zmniejszenia zawartości azotanów. Azotany są nie tylko uciążliwe, ale i szkodliwe. Bowiem:

- 1) przyczyniają się do powstawania kancerogennych nitrozoamin (1),
- 2) są jednym z istotnych czynników eutrofizacji (2,3),
- 3) obniżają efektywność biologicznej defosforylacji ścieków (4).

Zdolność do biochemicznego przeprowadzania procesów denitryfikacji całkowitej posiada znaczna liczba różnych szczepów bakterii. Jednak u zdecydowanej większości denitryfikatorów interesujący szlak jest „uruchamiany” dopiero w warunkach bardzo niskiej zawartości rozpuszczonego tlenu (5-7). Dzieje się tak, dlatego że posiadana przez te bakterie denitryfikacyjna reduktaza azotanowa (DNR — *denitrification nitrate reductase*), enzym inicjujący szlak denitryfikacji całkowitej, który jest inhibitowany przez O₂ (8). Schemat trzech szlaków denitryfikacji został zamieszczony w poprzedniej pracy autorów (6). Jedynie u *Thiobacillus denitrificans* enzym ten, jak się wydaje, jest mniej wrażliwy na tlen. Należy tu wyjaśnić, że w praktyce warunki do efektywnego funkcjonowania „wrażliwych” na tlen denitryfikatorów uzyskuje się w wyniku długotrwałej (co najmniej 15-godzinnej) sedymentacji (7). Podczas tak długotrwałej sedymentacji zachodzą równocześnie niekorzystne procesy

gnilne, co komplikuje dalsze etapy oczyszczania ścieków. W związku z tym podjęto kolejne próby zwiększenia efektywności procesów redukcji azotanów w bioreaktorze typu MEANDER, które polegały na doszczepianiu osadu czynnego kulturą *Thiobacillus denitrificans* DSM 807.

2. Badania kontrolne 24-godzinnej sedymentacji

Badania te, podobnie jak poprzednie, wykonano w pilotowej biologicznej oczyszczalni ścieków typu MEANDER znajdującej się na terenie Oczyszczalni Ścieków Komunalnych Kraków-Płaszów o przepustowości 160 000 m³/dobę, podczas gdy przepływ MEANDRA wynosił tylko 280 m³/dobę. We wcześniejszych badaniach dowiedziano, że procesy redukcji azotanów, których ładunek średniodobowy kształtował się na poziomie $\approx 1,12$ kg, zachodziły głównie w komorach MEANDRA naprzemiennie napowietrzanych w trakcie sedymentacji, jednak ich efektywność nie przekraczała 20% (6,7). Z tego też względu uznano za właściwe ponowne przeprowadzenie analiz podczas 24-godzinnej sedymentacji. Było to tym bardziej interesujące, że poprzednio ograniczono się do jednej próby (maj) i siłą faktu nie obejmowała ona sezonu obniżonej aktywności mikroorganizmów, tj. od listopada do kwietnia.

W pracy tej pominięto opis bioreaktora typu MEANDER, ponieważ dokładne dane techniczne tego obiektu przedstawiono w naszej wcześniejszej publikacji (6).

Biorąc pod uwagę możliwość przebiegu trzech szlaków denitryfikacji: dysymilacyjnej, całkowitej (do pożądanego produktu jakim jest N₂), częściowej (do NH₃) i asymilacyjnej (głównie do białek) w ściekach oznaczano:

— azotany, metodą kolorymetryczną, różnicową wg Hermanowicza i wsp. (9), stosując kilkakrotne wytrząsanie ścieków z proszkiem cynku jako reduktorem (błąd tej metody wynosił $\pm 0,5\%$);

— azotyny, metodą kolorymetryczną (9 — błąd $\pm 0,1\%$);

— amoniak, metodą kolorymetryczną Nesslera (z czterojodortęcianem potasu [K₂(HgJ₄)] z zastosowaniem odczynników i skali wzorców firmy Merck (z dokładnością $\pm 10\%$);

— białka, metodą Lowry'ego (z błędem $\pm 0,1\%$).

Ze względu na niską dokładność metody oznaczanie amoniaku przeprowadzano w 3–5 równoległych próbach, natomiast oznaczanie pozostałych składników wykonywano tylko w 2 próbach.

Próby 24-godzinnej sedymentacji zostały przeprowadzone w listopadzie, styczniu i kwietniu, tj. w okresie, gdy intensywność procesów biologicznych jest obniżona. Jednakże zróżnicowanie temperatury w dniach pomiarów było niewielkie, z uwagi na łagodną zimę. Tej niewielkiej rozpiętości temperatur otoczenia należałoby przypisać tylko nieznaczną zmienność efektywności redukcji azotanów zamieszczoną w tabeli 1 (i pozostałych) jako Δ , a obliczaną wg następującego wzoru:

$$\Delta_{\text{NO}_3^-} = [(c_{24} - c_0) \cdot c_0^{-1}] \cdot 100\% \quad [1]$$

gdzie:

c_{24} — koncentracja NO_3^- w czasie t_{24} [μM]

c_0 — koncentracja NO_3^- w czasie t_0 [μM]

Natomiast wartości efektywności przyrostu białka, a tym samym biomasy zawiesiny mikroorganizmów, obliczone analogicznie jak efektywność redukcji azotanów były zaskakujące. Najwyższą bowiem wartość stwierdzono w próbie przeprowadzonej w listopadzie, zaś najniższą w kwietniu (por. A z C — tab. 1). Tymczasem najkorzystniejszy rozwój mikroorganizmów (nie tylko w środowisku wodnym) winien następować od wiosny do jesieni. Równocześnie z dużym przyrostem białka zaobserwowano 2-krotny wzrost koncentracji amoniaku. W związku z tym można przypuszczać, że jest on produktem dysymilacyjnej denitryfikacji częściowej, przeprowadzanej jednak przez inne bakterie niż redukujące siarczany, ponieważ bakterie te wykazują słabą aktywność w analizowanym okresie roku (dane nie publikowane).

Inną wielkością, która zdaniem autorów dobrze odzwierciedla przebieg pożądaných procesów jest szybkość (k) redukcji azotanów obliczaną wg wzoru:

$$k_{\text{NO}_3^-} = (c_0 - c_n) \cdot t_n^{-1} [\mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}] \quad [2]$$

gdzie:

c_0 i c_n — koncentracje NO_3^- w czasie t_0 i w czasie t_n

Znalezione wartości k wskazują, że procesy denitryfikacji przebiegają z największą szybkością w styczniu (rys. 1). To nieoczekiwane zjawisko, jak się wydaje, można najprawdopodobniej wiązać z sezonowymi zmianami aktywności innych grup bakterii, np. bakterii, redukujących siarczany (dane nie publikowane), które w styczniu – lutym także wykazują znacznie wyższą aktywność niż jesienią, a jeszcze bardziej niż wiosną. W związku z tym nasuwa się przypuszczenie, że sezonowa zmienność aktywności różnych grup mikroorganizmów, występujących w oczyszczalniach ścieków komunalnych wymaga dokładnych badań.

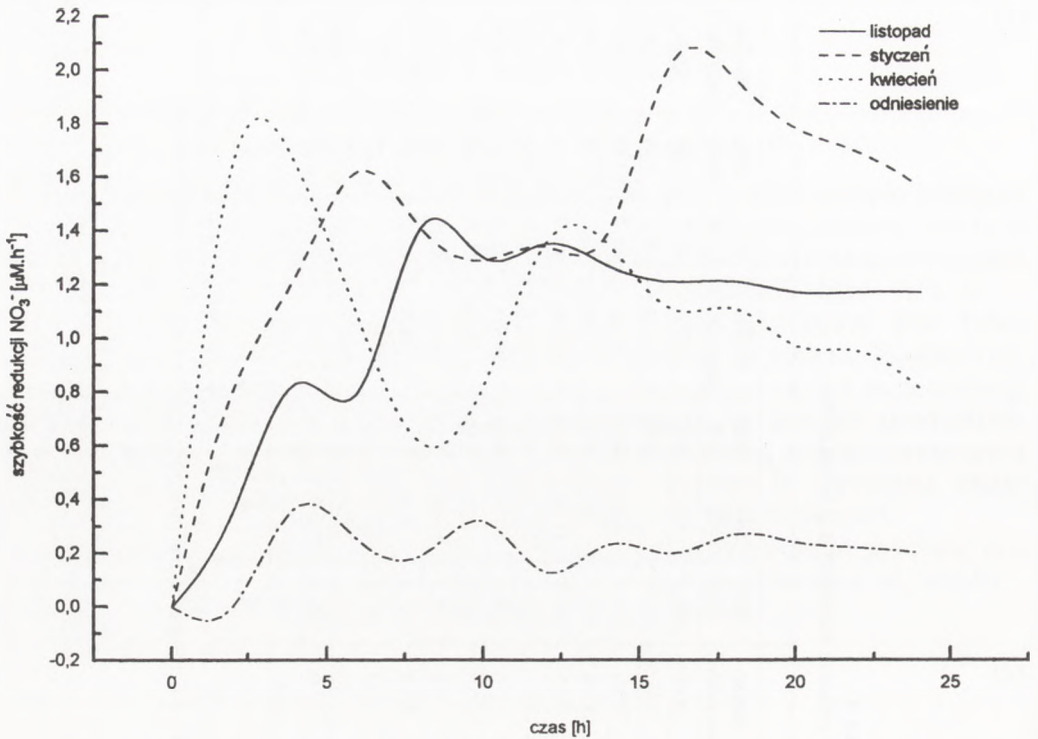
3. Badania laboratoryjne

Celem badań laboratoryjnych było określenie warunków dla najefektywniej przeprowadzanego szlaku denitryfikacji całkowitej przez bankowy szczep *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*). Próby wykonano w dwóch 24-godzinnych seriach w zlewkach pojemności 2 dm³, które dobrano tak by stosunek powierzchni cieczy (znajdującej się w tym naczyniu) do jej objętości był taki sam jak w komorach MEANDRA. Przygotowano następujące wersje prób:

TABELA 1
AZOTANY, AZOTYNY, AMONIAK I BIAŁKO W PRÓBACH SEDYMENTACJI 24-GODZINNEJ

Czas pomiaru [h]	A			B			C			D					
	NO ₃ [μM]	NO ₂ [μM]	NH ₃ [μM]	białko [mg/dm ³]	NO ₃ [μM]	NO ₂ [μM]	NH ₃ [μM]	białko [mg/dm ³]	NO ₃ [M]	NO ₂ [M]	NH ₃ [M]	białko [mg/dm ³]	NO ₃ [μM]	NH ₃ [μM]	białko [mg/dm ³]
0 ^a	50,0	1,5	294	18,0	77,4	6,5	270	30,0	45,2	2,1	294	40,0	46,7	294	45,0
2	48,3	3,2	294	24,0	75,8	7,6	270	35,0	41,9	2,1	294	40,0	46,7	294	45,0
4	46,7	3,2	412	28,0	72,5	8,7	270	36,0	41,9	6,5	294	45,0	45,2	294	47,0
6 ^b	45,2	3,9	412	32,0	67,7	10,8	294	37,0	38,7	7,6	294	57,0	45,2	294	49,5
8	38,7	6,5	470	37,0	66,1	10,8	294	49,0	40,3	10,8	294	63,0	45,2	294	47,0
10	37,0	10,8	412	50,0	64,5	13,0	270	49,1	37,0	11,9	353	67,5	43,5	353	51,0
12 ^c	33,8	23,9	588	n.o.	61,3	17,4	294	57,5	29,0	14,5	353	69,0	45,2	294	50,0
14	32,2	19,5	588	91,0	58,0	19,5	294	65,0	29,0	13,0	353	75,0	43,5	294	53,0
16	30,6	27,1	588	95,0	45,1	32,6	305	85,0	27,4	15,2	470	81,0	43,5	323	50,5
18	30,6	28,2	598	98,0	41,9	34,7	305	90,5	27,4	17,3	412	88,5	41,9	294	45,5
20 ^d	29,0	28,2	588	n.o.	41,9	32,6	270	101,0	25,8	23,9	412	94,0	41,9	323	57,0
22	29,0	22,8	588	99,0	40,3	32,6	282	110,0	24,2	21,7	470	100,0	41,9	353	60,0
24	29,0	21,7	588	99,0	40,3	31,5	294	109,0	25,8	23,9	470	99,5	41,9	323	65,5
Δ[%]	-42	-	-	450	-48	-	-	263	-43	-	-	150	-7	-	-

A — listopad, temperatura otoczenia: a) 0°C, b) +2, c) -1, d) -4°C; B — styczeń: a) +4°C, b) +7, c) +5, d) +2°C; C — kwiecień: a) +10°C, b) +15, c) +14, d) +8°C; D — odmlnienie, komora napowietrzania, temperatura otoczenia jak w C; n.o. — nie oznaczano.



Rys. 1. Szybkość redukcji azotanów podczas 24-godzinnej sedymentacji, odniesienie komora napowietrzania.

A — zlewka wypełniona ściekami z MEANDRA z zawiesziną osadu czynnego i pozostawiona do sedymentacji (początkowa zawartość tlenu kształtowała się w granicach 20-35 μM);

B — zawartość zlewki jw., ale stale napowietrzana za pomocą napowietrzacza akwaryjnego, dzięki któremu uzyskiwano natlenienie medium 150-165 μM O_2 , jednakże nie dokonywano pomiarów ciągłych;

C — ściek znad osadu czynnego, pozostawiony do sedymentacji.

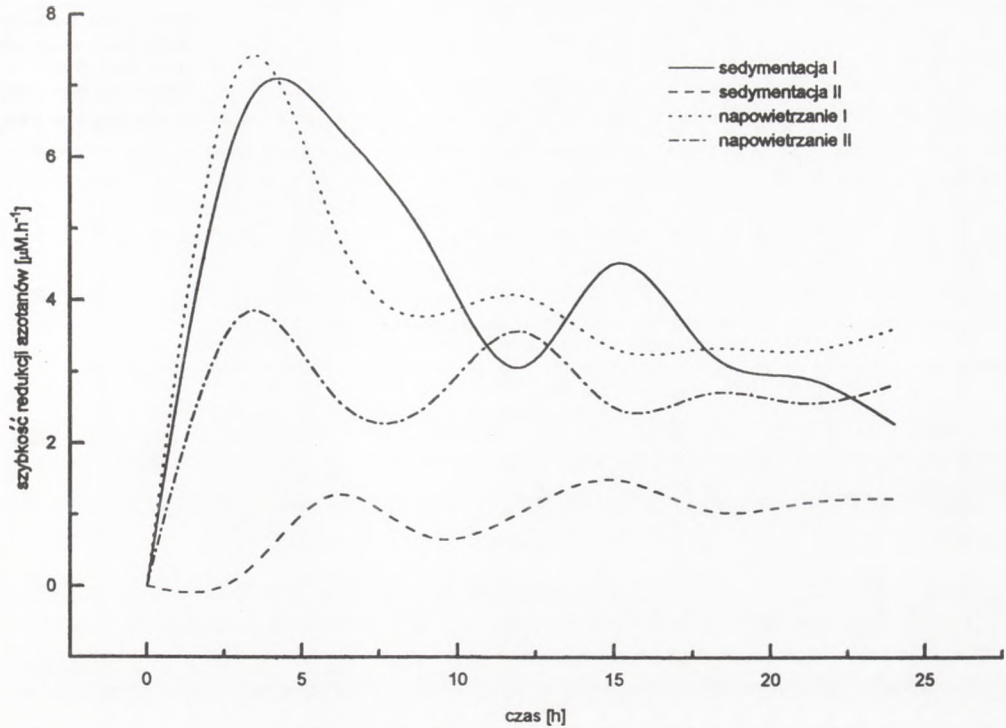
Ponadto przeprowadzono pojedyncze próby w następujących wersjach:

D — próba kontrolna na pożywce wg receptury banku szczepów DSM;

E — ściek jak w A, do którego dodano tiosiarczanu sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) w ilości zgodnej z recepturą DSM, pozostawiony do sedymentacji;

F — ściek jw., ale napowietrzany napowietrzaczem akwaryjnym.

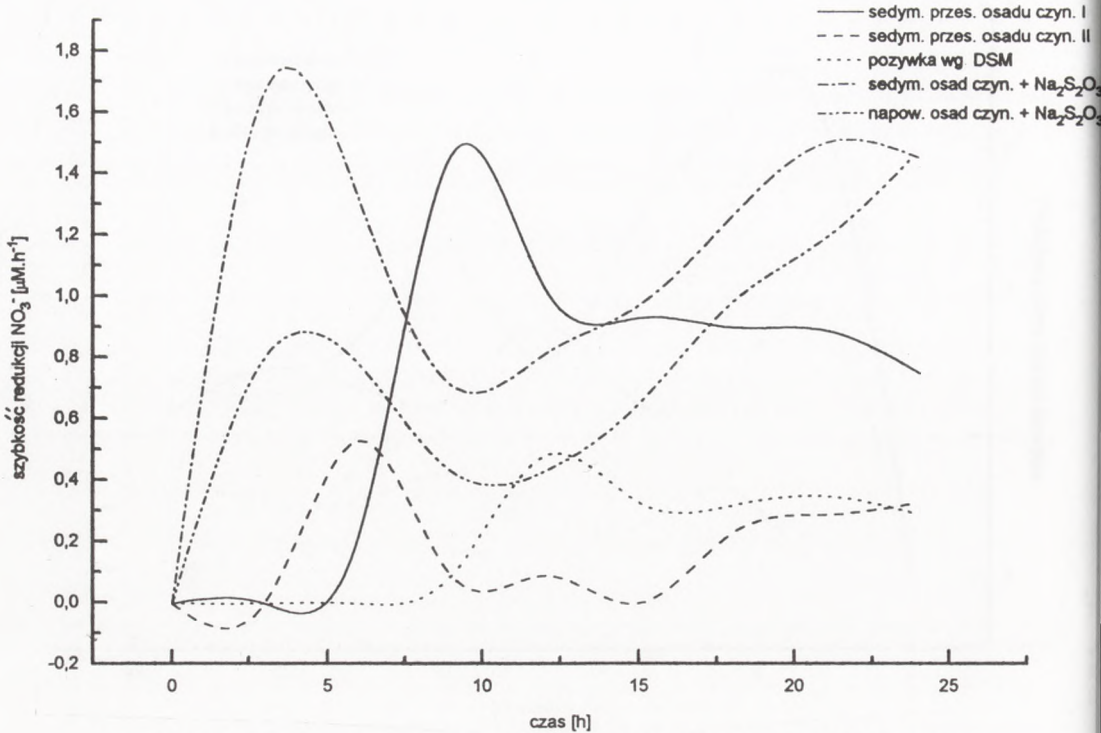
Do każdej z prób imitujących komory MEANDRA (umownie dalej nazywanych „modelami”) oraz próby kontrolnej wprowadzono po 100 cm^3 kultury *Thiobacillus denitrificans*, w których przybliżoną liczebność komórek tych bakterii oszacowywano na $10^5 - 10^6$ w 1 cm^3 . Zawartość tlenu określano metodą potencjometryczną za pomocą czujnika tlenowego CTN-9202 S firmy MES-EKO (będącego odpowiednikiem elektrody Clarcka) i tlenomierza firmy ELMETRON).



Rys. 2. Szybkość redukcji azotanów w badaniach modelowych z osadem czynnym i *Th. denitrificans*.

Uzyskane wyniki potwierdzają trafność wdrażanej biotechnologii osadu czynnego w oczyszczalniach ścieków komunalnych. Bowiern efektywność redukcji azotanów (ΔNO_3^-) w „modelach” z osadem czynnym jest 3 nawet do 9 razy większa niż w próbach bez niego (por. A, B i E, F z C czy D — tab. 2). Obliczone wartości Δ wskazują ponadto, że wśród „modeli” z osadem czynnym, próby napowietrzane cechuje wyższa efektywność redukcji azotanów (B I -98, II -52, zaś F -29%) w porównaniu z próbami pozostawionymi do sedymentacji (A I -63, II -27 czy E -23%). Być może świadczy to o tym, że dla funkcjonowania *Th. denitrificans* warunki tlenowe są nieco korzystniejsze. Również znalezione wartości szybkości ($k_{\text{NO}_3^-}$) wskazują na korzystny wpływ napowietrzania na szlak denitryfikacji całkowitej w badanych „modelach” (tab. 2). Pozytywny wpływ tlenu był bardziej widoczny w drugiej serii badań (rys. 2). Należy zauważyć, że kinetyka redukcji NO_3^- podczas prowadzenia badań w obu seriach w „modelach” napowietrzanych miała podobny przebieg, czego nie obserwowano w próbach pozostawionych do sedymentacji (rys. 2 i 3).

Natomiast na podstawie obliczonych wartości efektywności przyrostu białka (Δ) nie można jednoznacznie ocenić wpływu tlenu. Wprawdzie w pierwszej serii badań wyższe wartości wykazywała próba napowietrzana (A — 90,2



Rys. 3. Szybkość redukcji azotanów w badaniach laboratoryjnych z *Th. denitrificans*.

zaś B — 135,0%) to jednak w drugiej serii sytuacja była odwrotna (A + 108,4, a B + 96,9% — tab. 2).

Również interesującym problemem był wpływ dodawanego tiosiarczanu. Mimo że użyty tu szczep bakterii wymaga do swego rozwoju jonów tiosiarczanowych (zgodnie z recepturą pożywki wg banku szczepów DSM 5 g dm⁻³), to jednak nie zaobserwowano korzystnego wpływu dodawania tego związku na funkcjonowanie doszczepianych bakterii (tab. 2, rys. 3). Świadczyć to może o obecności S₂O₃²⁻ w ściekach, dlatego też wprowadzanie dodatkowej ilości tiosiarczanu stanowiło jego nadmiar. W późniejszych analizach ścieków rzeczywiście wykazano, że średnia zawartość tego związku wynosi 0,075 M. Tymczasem wg receptury przewidywana jest ponad dwukrotnie niższa koncentracja Na₂S₂O₃. Tiosiarczan jest metabolitem pośrednim w łańcuchu oddychania siarczanowego u bakterii redukujących siarczany (10,11), a jego transport przez ścianę komórkową jest odwracalny (12). Tiosiarczan może być zatem obecny w ściekach, zwłaszcza przy niepełnym oczyszczaniu mechanicznym.

Najniższe wartości dla próby kontrolnej, w której *Th. denitrificans* rozwijał się na pożywce wg receptury bankowej są zrozumiałe, ponieważ nie są one przewidziane do intensywnego namnażania i rowoju danego szczepu.

TABELA 2
AZOTANY, AZOTYNY, AMONIAK I BIAŁKO W MODELACH LABORATORYJNYCH „MEANDRA” Z UDZIAŁEM *Thiobacillus denitrificans* DSM 807

Czas pomiaru [h]	A				B				C				D	E	F
	NO ₃ [μM]	NO ₂ [μM]	NH ₃ [μM]	białko [mg/dm ³]	NO ₃ [μM]	NO ₂ [μM]	NH ₃ [μM]	białko [mg/dm ³]	NO ₃ [μM]	NO ₂ [μM]	NH ₃ [μM]	białko [mg/dm ³]	NO ₃ [μM]	NO ₃ [μM]	NO ₃ [μM]
0	I 86,7	105,8	1176	82,3	91,9	103,9	1323	85,5	80,8	101,0	1470	57,6	75,0	-	-
	II 127,7	25,8	1470	42,9	133,8	23,9	1176	55,6	119,3	6,5	1323	37,3	-	130,6	129,0
3	I 67,2	126,9	1176	92,9	70,1	116,3	1323	95,2	83,0	115,8	1323	68,2	76,6	-	-
	II 127,4	37,1	1470	44,0	122,5	30,4	1470	60,0	119,3	6,5	1176	59,0	-	125,6	126,6
6	I 47,7	132,8	1470	94,1	61,4	149,7	1176	82,9	79,5	118,0	1323	99,1	75,8	-	-
	II 120,1	44,5	1176	56,3	117,7	38,0	1470	61,3	116,1	6,9	1176	60,0	-	122,7	124,3
9	I 43,0	137,6	1470	107,6	58,0	154,5	1176	98,2	67,7	132,1	1470	70,5	74,2	-	-
	II 121,4	47,8	1470	49,0	11,2	46,9	1323	60,5	118,5	7,8	1176	57,9	-	124,2	125,1
12	I 50,1	139,1	1470	95,2	43,2	165,2	1470	108,8	68,5	136,3	1323	88,8	69,3	-	-
	II 115,3	45,0	1470	51,2	91,1	57,8	1323	65,4	118,2	7,6	1176	65,0	-	120,9	123,8
15	I 19,2	138,2	1176	126,4	42,1	183,2	1176	134,1	66,9	140,2	1470	97,5	70,1	-	-
	II 105,4	46,0	1470	70,0	96,3	73,9	1176	73,1	119,0	10,8	1029	59,0	-	116,1	119,3
18	I 27,4	144,3	1323	124,7	32,1	193,7	1470	154,1	64,6	136,5	1470	109,4	69,3	-	-
	II 108,5	47,1	1323	68,8	85,3	74,7	1176	79,9	115,1	10,8	1176	70,0	-	107,9	111,4
21	I 25,3	146,0	1323	145,3	23,0	200,4	1470	164,7	62,1	144,3	1323	110,0	67,7	-	-
	II 103,3	50,2	1470	75,6	80,0	86,5	1323	88,0	113,2	11,9	1323	70,5	-	99,1	104,0
24	I 32,2	145,4	1323	156,5	5,6	206,3	1176	201,7	62,9	137,1	1470	107,9	68,0	-	-
	II 98,5	51,5	1470	89,4	66,1	93,6	1323	109,5	111,3	13,0	1176	70,0	-	95,9	93,5
Δ[%]	I -63	-	-	90,2	-98	-	-	135,9	-22	-	-	87,3	-10	-	-
	II -27	-	-	108,4	-52	-	-	96,9	-6	-	-	87,7	-23	-	-29
k [μM/h]	1,744*	-	-	-	3,208*	-	-	-	0,540*	-	-	-	0,292	1,446	1,479

A — sedymentacja z osadem czynnym; B — napowietrzanie z osadem czynnym; C — sedymentacja, ścieki bez osadu czynnego; D — próba kontrolna na pożywcę przygotowanej wg receptury banku szczepów DSM; E — sedymentacja osad czynny z dodatkiem Na₂S₂O₃ w ilości jak w D (Δ białka = 27,6%); F — napowietrzany osad czynny plus Na₂S₂O₃ jak w D (Δ białka = 36,8%); * — średnie z dwóch serii.

4. Próby doszczepiania osadu czynnego kulturą *Thiobacillus denitrificans*

Na podstawie modelowych badań laboratoryjnych wytypowano komory do przeprowadzenia prób doszczepiania osadu czynnego bioreaktora typu MEANDER. Pierwszą próbę wykonano we wrześniu wprowadzając kulturę *Th. denitrificans* do komory naprzemiennie napowietrzanej i sedymentowanej. Następną próbę przeprowadzono w maju w komorze napowietrzanej w sposób ciągły. Namnażanie bakterii prowadzono do uzyskania 180 dm³ kultury. Pożywkę do namnażania wymienionych denitryfikatorów przygotowywano wg własnej receptury (13).

W trakcie prób poza wykonywaniem oznaczeń związków azotu w ściekach za pomocą opisanych już metod określano także skład gazu metodą chromatografii gazowej za pomocą chromatografu CARLO ERBA VEGA 6300 na kolumnach Porapak QS (zawartość CO₂, H₂O i O₂/N₂) oraz kolumnach Mol-sieb 5A (rozdziela O₂ od N₂); błąd oznaczania tlenu wynosił 2%, zaś azotu 1%. Próbkę gazu pobierano z pęcherzyków piany pokrywającej powierzchnię ścieków. Ze względu na trudności w pobieraniu próbek gazu, w celu zwiększenia wiarygodności otrzymywanych wyników zwiększono do pięciu liczbę pobieranych próbek.

Uzyskane wyniki w próbach doszczepiania osadu czynnego kulturą *Th. denitrificans* przeprowadzonych bezpośrednio w komorach MEANDRA potwierdziły rezultaty otrzymane w „modelach” laboratoryjnych (por. tab. 2 i 3). Tylko nieco niższe wartości efektywności i szybkości redukcji azotanów (ΔNO_3^- oraz $k_{\text{NO}_3^-}$) należy przypisać powiększeniu skali rzędu kilkudziesięciu tysięcy razy. Porównanie obliczonych wartości efektywności przyrostu białka dla prób „modelowych” i przeprowadzonych bezpośrednio w bioreaktorze jest niewłaściwe, ponieważ „modele” laboratoryjne miały charakter stacjonarny, podczas gdy w MEANDRZE następował przepływ ścieków. W próbie prowadzonej w komorze naprzemiennie sedymentowanej i napowietrzanej (w tab. 3 określonej symbolem S) odpływ ścieków z komory sedymentowanej i równoczesny dopływ do komory napowietrzanej odbywał się w cyklu 12-godzinnym. Natomiast podczas prowadzenia próby w komorze napowietrzanej w sposób ciągły (w tab. 3 określonej symbolem N) był utrzymywany normalny 6-godzinny cykl przepływu ścieków. Z tego też względu wartości wskaźnikowe prezentowane w tabeli 3 obliczono na podstawie wyników otrzymanych po 21 godzinach prowadzenia próby. Mimo takiego założenia obliczona efektywność przyrostu białka dla próby w komorze S przyjmuje wartości ujemne, co dowodzi spływu dużej ilości biomasy osadu czynnego wraz ze ściekami. W związku z tym przeliczono przyrost białka jeszcze w inny sposób, a mianowicie jako stosunek:

$$\text{przyrost białka} = c_{t_0}/c_{t_n} \quad [3]$$

gdzie:

c_{t_0} i c_{t_n} — koncentracje białka w czasie t_0 i odpowiednio t_n , tj. w czasie kolejnego pomiaru.

TABELA 3
AZOTANY, AZOTYNY, AMONIAK I BIAŁKO W ŚCIEKACH „MEANDRA” ORAZ SKŁAD GAZU SUCHEGO
PO DOSZCZĘPIENIU KULTURĄ *Th. denitrificans* DSM 807

Czas [h]		NO ₃ ⁻ [μM]	NO ₂ ⁻ [μM]	NH ₃ [μM]	białko [mg/dm ³]	O ₂ [%]	N ₂ [%]	CO ₂ [%]
0	S	53,2	5,2	294	115,3	20,92	79,08	
	N	95,1	41,3	470	70,0	21,26	78,74	
						P ₁ : 21,02 P ₂ : 21,40	P ₁ : 79,00 P ₂ : 78,60	
1	N	90,3	41,3	411	70,0			
3	S	46,5	1,38	294	129,8	20,74	79,07	0,19
	N	82,3	50,0	411	80,0			
5	S	38,7	27,1	294	164,3	19,84	79,99	0,17
	N	72,6	58,7	470	85,5			
7	S	29,5	34,9	323	98,7			
	N	75,8	63,0	470	90,0			
9	S	17,7	42,6	441	68,5			
	N	66,17	73,9	588	90,0			
11	N	61,3	78,2	588	85,5	20,90	79,10	
13	S	16,3	30,4	323	95,2			
	N	59,6	78,2	588	90,0			
15	N	54,8	76,0	588	100,0			
17	S	23,9	30,4	323	78,9			
	N	56,4	78,2	588	90,0			
19	S	11,5	37,4	323	96,7			
	N	50,0	73,9	588	110,0			
21	S	15,1	23,5	294	58,9			
	N	50,0	71,7	588	85,0			
23	N	48,3	69,5	588	90,5	20,93	79,07	
26	S	115,0	28,4	441	52,3			
29	S	11,1	30,4	588	66,8	20,98	78,74	0,28
32	S	37,0	76,2	588	52,5	20,99	78,79	0,22
	N	33,8	26,0	470	95,0			
50	S	41,9	76,0	618	62,2	20,88	78,38	0,74
56	S	16,1	91,5	735	84,3	20,99	78,80	0,21
	N	43,5	32,6	294	145,0	21,27	78,74	
170	N	35,4	20,2	588		20,63	79,37	
Δ [%]	S	-72*			-48,9*			
	N	-47*			21,4*			
k [μM/h]	S	1,81*						
	N	2,15*						

S — w komorze naprzemiennie sedymentowanej i napowietrzanej; N — w komorze napowietrzanej w sposób ciągły; P — średnie dla powietrza: 1 — podczas próby S, 2 — podczas próby N; * — po 21 h.

Na podstawie tak przeliczonych wartości przyrostu białka został wykonany rysunek 5.

Niezależnie od sposobu przeliczania bardziej wiarygodne są wyniki zawartości białka uzyskane w próbie przeprowadzonej w komorze napowietrzanej w sposób ciągły (tab. 3). Nie tylko bardziej wiarygodne, ale i korzystniejsze wielkości wskaźnikowe dla komory ostatnio wymienionej należy wiązać z poziomem rozpuszczonego tlenu. W komorze słabo, ale stale napowietrzanej, może się znajdować od 25 μM do 220 μM O_2 (6). Zbliżona zawartość tlenu występuje w komorach pracujących w cyklu naprzemiennym, ale tylko podczas sedimentacji bo od 35 do 175 μM O_2 . Natomiast w tych samych komorach, ale podczas napowietrzania koncentracja tlenu może przekraczać nawet 300 μM (312,6 μM O_2).

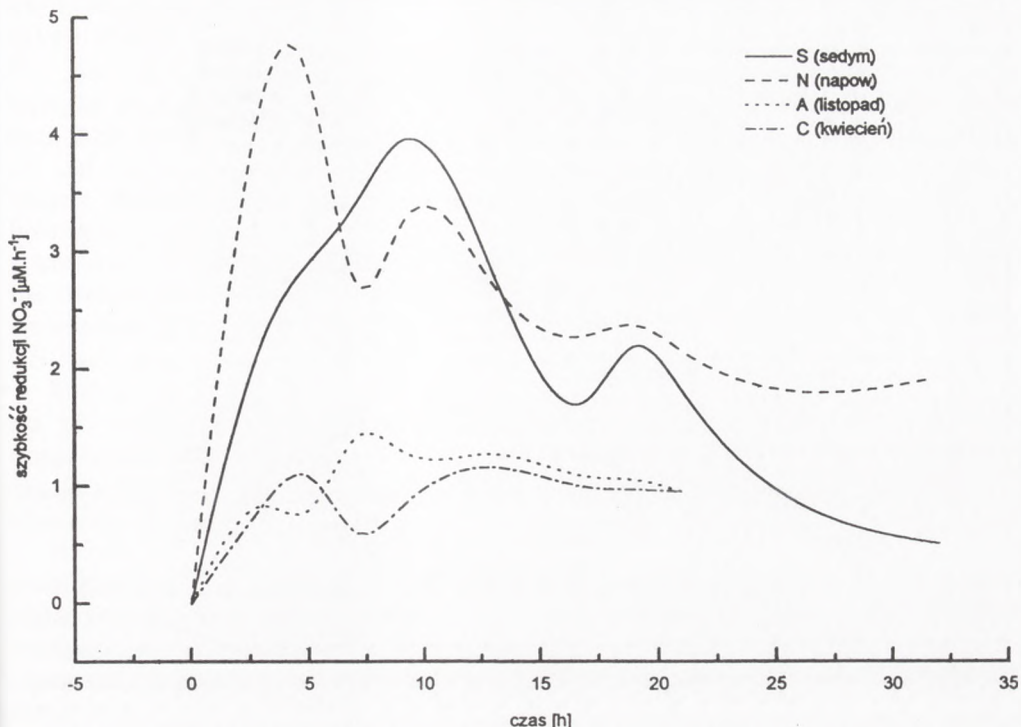
Poza tym w trakcie prób zaobserwowano, że stężenia azotynów i amoniaku wzrastały do dziewiątej godziny, a nawet jedenastej, po czym następowała ich stabilizacja. Natomiast analizy gazów wskazują, że w powietrzu tuż nad powierzchnią ścieków w komorach MEANDRA znajduje się nieco więcej azotu (o 0,5, a nawet o 1,0%) niż w próbach powietrza pobranych w odległości około 10 m dalej (w tab. 3 jako P), a także od prób wyjściowych, tj. pobranych tuż przed wprowadzeniem kultury doszczepiającej (w czasie t_0). Wyższa zawartość N_2 może stanowić dalszy dowód na wzmożony przebieg dysymilacyjnej denitryfikacji całkowitej po doszczepieniu osadu czynnego kulturą *Th. denitrificans*.

5. Dyskusja i wnioski

Technologia biologicznego oczyszczania ścieków z zastosowaniem osadu czynnego znana jest już od kilkadziesiąt lat (14). Korzyści płynące z jej wdrażenia są oczywiste i nie podlegają dyskusji (2). Przeprowadzone obecnie badania dostarczają kolejnych dowodów. Bowiem w laboratoryjnych próbach modelowych z udziałem *Th. denitrificans*, ale bez osadu czynnego, efektywność, a jeszcze bardziej szybkość redukcji azotanów, była kilkakrotnie niższa w porównaniu z próbami zawierającymi osad czynny (por. A i B z C — tab. 2).

Jednak stosowane w bioreaktorach intensywne napowietrzanie stwarza warunki preferencyjne dla mikroorganizmów aerobowych, a precyzyjniej dla biochemicznych procesów tlenowego łańcucha oddychania oraz szlaków z nim sprzężonych u tych mikroorganizmów. Przykładem takich mikroorganizmów są bakterie nitryfikacyjne. Dlatego, podczas intensywnego napowietrzania obserwuje się nawet wzrost poziomu azotanów w ściekach bioreaktora typu MEANDER (6).

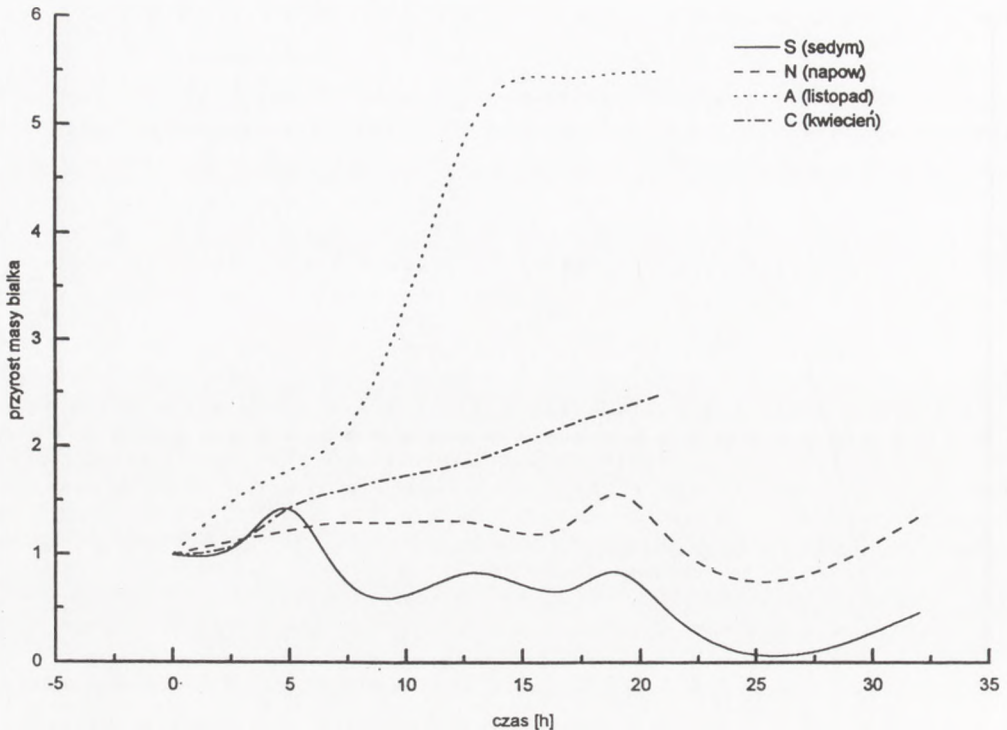
Natomiast szlak dysymilacyjnej denitryfikacji całkowitej zwany inaczej „łańcuchem utleniania azotanowego” nie tylko nie wymaga tlenu, ale wręcz enzymy tego szlaku są inhibitowane przez ten pierwiastek. Szczególnie wrażliwa na tlen jest denitryfikacyjna reduktaza azotanowa (DNR), która u większości denitryfikatorów już przy 3 μM O_2 w medium ulega dezaktywacji (8). Tylko u szczepów bakterii *Th. denitrificans* enzym ten jest znacznie „odpor-



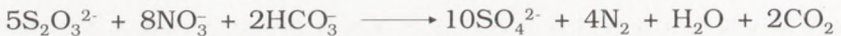
Rys. 4. Szybkość redukcji NO_3^- w komorach MEANDRA bez (A i C) i z *Th. denitrificans* (S i N); objaśnienia w tekście.

niejszy”, bo jak wynika z uzyskanych danych jest on aktywny, gdy w ściekach zawartość tlenu rozpuszczonego wynosi nawet powyżej $30 \mu\text{M}$ (tab. 3, rys. 4). Jednocześnie stosując niezbyt intensywne napowietrzanie bioreaktora stwierdza się, że przyrost białka, a tym samym biomasy, jest nieznaczny i w miarę stabilny (rys. 5). Jest to korzystne z punktu widzenia technicznego, ponieważ nie komplikuje transportu (przepływu) ścieków. W związku z tym szczepy tego gatunku bakterii należy uznać za najkorzystniejsze, spośród powszechnie znanych denitryfikatorów; doszczepianie osadu czynnego kulturą tych bakterii zwiększa efektywność procesów redukcji azotanów z 7 (tab. 1 D) do 47 % (tab. 3 N).

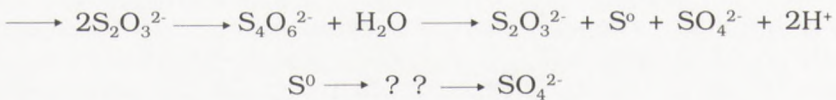
Oznaczanie azotanów w ściekach i analizy gazów pobranych z ich powierzchni świadczą o tym, że pożądane efekty wprowadzonych dodatkowo bakterii denitryfikacyjnych są bardzo wyraźne w pierwszej dobie eksperymentu (tab. 3, rys. 4). Dalsze pomiary wskazują, że ich działanie słabnie. Być może na słabnące tempo szlaku denitryfikacji ma wpływ zbyt wysoki poziom tiosiarczanów, który ponad dwukrotnie przekracza zawartość przewidzianą bankową recepturą pożywki. U *Th. denitrificans* szlak denitryfikacji jest sprzężony z procesami utleniania tiosiarczanów, co prezentujemy na schematycznym zapisie (15):



Rys. 5. Przyrost masy białka w komorach MEANDRA bez (A i C) i z *Th. denitrificans* (S i N); objaśnienia w tekście.



Tymczasem, jak wykazali Meulenberg i wsp. (16) u innego miksotroficznego gatunku z rodzaju *Thiobacillus* (*Th. acidophilus*) tempo i charakter utleniania tiosiarczanu jest zależne od koncentracji tego substratu, ponieważ przebiega wg schematu reakcji:



Cytowani autorzy na podstawie swoich badań wysunęli sugestię, że tiosiarczan (podobnie jak inne metabolity pośrednie) jest kumulowany wewnątrzkomórkowo i dlatego limituje konsumpcję tlenu; przy niskich stężeniach tiosiarczanu takiego ograniczenia nie stwierdzono. Można zatem przypuszczać, że skoro tiosiarczan limituje wykorzystanie tlenu jako końcowego akceptora elektronów to może również ograniczać inny łańcuch transportu elektronów z azotanem jako końcowym ich akceptorem. W próbach z dodat-

kiem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ badanych laboratoryjnie intensywność redukcji azotanów jest także kilkakrotnie niższa niż w próbach bez tiosiarczanu (por. rys. 2 seria II z rys. 3). Ponadto próba napowietrzana (około $150 \mu\text{M O}_2$) już w początkowym okresie 4 – 6. godzin od zaszczepienia kulturą denitryfikatorów wykazywała jeszcze niższe tempo denitryfikacji niż próba sedymentowana (około $25 \mu\text{M O}_2$). Odwrotną relację obserwowano w próbach bez dodatku tiosiarczanu. Świadczyć to może o możliwości „przełączania” przez *Th. denitrificans* łańcucha transportu elektronów z końcowym akceptorem NO_3^- na łańcuch z końcowym akceptorem O_2 w warunkach wysokiej koncentracji tiosiarczanu. Słabnące funkcjonowanie *Th. denitrificans* jako denitryfikatora może być spowodowane przedłużającymi się warunkami wysokich koncentracji O_2 i $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ prowadzącymi do „rozprzęgnięcia” szlaku denitryfikacji.

Należy nadmienić, że oznaczanie tiosiarczanów w ściekach przeprowadzono po wykonaniu prób doszczepiania kulturą *Th. denitrificans*, ponieważ dotychczas nie było takiej potrzeby ani zainteresowania. Oznaczenia tiosiarczanów nie uwzględniają bowiem żadne obowiązujące dotychczas normatywy klasyfikacji wód.

Innym interesującym zagadnieniem już wcześniej zauważonym (dane nie publikowane) jest sezonowa zmienność aktywności mikroorganizmów występujących w ściekach. W tym celu 24-godzinne próby sedymentacji przeprowadzono w różnych miesiącach sezonu od jesieni do wiosny, tj. w listopadzie, styczniu i kwietniu. Wszystko na to wskazuje, że temperatura otoczenia ma minimalny wpływ na zmiany aktywności mikroorganizmów występujących w ściekach. Jednakże zmiana aktywności sezonowej tych bakterii jest widoczna. Różnice te wyraźnie się uwidoczniły dopiero po obliczeniu wartości szybkości redukcji azotanów, bowiem wielkości efektywności tego procesu były zbliżone (tab. 1). Krzywe na rysunku 1 wykonanym na podstawie obliczonych wartości szybkości wskazują na zmienne nasilenie procesów denitryfikacji. W listopadzie i kwietniu po około 15. godzinach wysokie tempo redukcji azotanów wykazuje tendencję malejącą, podczas gdy w styczniu właśnie w tym czasie osiąga maksimum (tab. 1, rys. 1). Jest to o tyle zaskakujące, że w naszej strefie klimatycznej w zimie kinetyka procesów biologicznych jest najniższa. Tę pozorną anomalię można by tłumaczyć wyższą aktywnością właśnie w tym czasie bakterii redukujących siarczany (dane nie publikowane). Bakterie te są zdolne do redukcji siarczanów, ale w jeszcze większym stopniu tiosiarczanów (10).

W związku z tym nasuwają się następujące wnioski:

— *Th. denitrificans* jest najkorzystniejszym gatunkiem denitryfikatorów w oczyszczaniu ścieków spośród dotychczas powszechnie znanych, ponieważ zdolny jest do redukcji azotanów w obecności wyższych zawartości tlenu w ściekach (do około $200 \mu\text{M}$), a doszczepianie osadu czynnego kulturą tych bakterii pozwala na około 7-krotne zwiększenie efektywności procesów redukcji azotanów;

— ponieważ szczepy *Th. denitrificans* do swego rozwoju wymagają tiosiarczanów należałoby w biologicznych oczyszczalniach ścieków wykonywać systematyczne oznaczanie zawartości jonów $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ i na tej podstawie regu-

lować napowietrzanie (np. przy wyższych koncentracjach tiosiarczanów zmniejszać napowietrzanie);

— ze względu na odwrotną zależność wpływu tlenu i tiosiarczanów na sprawność sprzężonych szlaków redukcji azotanów i utleniania tiosiarczanów u *Th. denitrificans* dla celów technologicznych należy doprecyzować optymalne zakresy stężeń obu tych składników;

— dalszych badań wymaga również sezonowa zmienność aktywności tych grup bakterii, które pozostają w istotnej relacji z denitryfikatorami, tj. bakterii redukujących siarczany i nitryfikacyjnych.

Literatura

1. Rowland I. R., (1988), in: *The Toxicology of N-nitroso Compounds; Nitrosoamines*, Ed. Hill M.J., Chichester, Ellis Horwood and VCH.
2. Buraczewski G., (1994), *Biotechnologia osadu czynnego*, PWN, Warszawa, 7-21.
3. Kawecka B., Elorante P. V., (1994), *Zarys ekologii glonów wód słodkich i środowisk lądowych*, PWN, Warszawa.
4. Barbusiński K., (1995), *Biotechnologia*, 2 (29), 153-163.
5. Błaszczuk M., (1992), *Acta Microbiologica Polonica*, 41 (3/4), 203-210.
6. Pado R., Paśmionka I., Pawłowska-Ćwiąg L., Starzyk K., (1995), *Biotechnologia*, 2 (29), 164-178.
7. Pado R., Paśmionka I., Pawłowska-Ćwiąg L., Starzyk K. (1995), *Acta Hydrobiol.*, 37 (3), 163-170.
8. Tiedje J. M., (1988), in: *Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium; Biology of Anaerobic Microorganisms*, Ed. Zehnder A. J. B., New York, Chichester, Wiley-Liss, 179-244.
9. Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Kozirowski B., (1976), *Fizykochemiczne metody badania wody i ścieków*, Arkady, Warszawa.
10. Badziong W., Thauer R. K., (1978), *Arch. Microbiol.*, 117, 209-214.
11. LeGall J., Fauque G., (1988), in: *Dissimilatory reduction of sulfur compounds; Biology of Anaerobic Microorganisms*, Ed. Zehnder A. J. B., New York, Chichester, Wiley-Liss, 587-639.
12. Stahlmann J., Warthmann R., Cypionka H., (1991), *Arch. Microbiol.*, 155, 554-558.
13. Pado R., Pawłowska-Ćwiąg L., Starzyk K., (1996), Zgłoszenie projektu wynalazczego P 313923.
14. Gańczarczyk J., (1966), *Oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego*, Arkady, Warszawa.
15. Stouthamer A. H., (1988), in: *Dissimilatory reduction of oxidized nitrogen compounds; Biology of Anaerobic Microorganisms*, Ed. Zehnder A. J. B., New York, Chichester, Wiley-Liss, 245-303.
16. Meulemberg R., Pronk J. T., Hazen W., Bos P., Kuenen J. G., (1992), *Arch. Microbiol.*, 157, 161-168.

The denitrification processes in biological station MEANDER with *Thiobacillus denitrificans*

Summary

This paper discusses the effect *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 has on the denitrification processes in the municipal sewage treatment plant MEANDER. The experiments consisted of

three stages. At the first stage, the efficiency of denitrification process in MEANDER's chambers was analysed. The research was conducted in the spring-autumn period. The results proved the occurrence of weak denitrification during 24 h sedimentation periods. It must be noted that the strongest denitrification occurred in January. At the second stage, laboratory tests proved that in the conditions of moderate aeration *Th. denitrificans* shows the same denitrification path as in the conditions of zero aeration. On the other hand, slowing down the denitrification processes in the conditions of high concentration of tiosulfate was observed. At the third stage, attempts to inoculate activated sludge in the chambers of MEANDER with *Th. denitrificans* culture showed that the intensity of nitrate reduction increased several times in comparison to the analogous process without inoculation.

Key words:

denitrification, *Th. denitrificans*, municipal sewage treatment.

Adres do korespondencji:

Ryszard Pado, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, ul. Podbrzezie 3, 31-054 Kraków, fax 22-16-98.