

Preparowanie kłaczków osadu czynnego do badań struktury wewnętrznej

Krzysztof Barbusiński
Helena Kościelniak
Politechnika Śląska
Gliwice

1. Wprowadzenie

Proces biologicznego oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego przebiega w dwóch podstawowych etapach. Etap I obejmuje przekształcanie na drodze biochemicznej rozpuszczonej materii organicznej w materiał komórkowy oraz przyłączanie cząstek koloidalnych przez przyrastającą biomasę. Etap II ma na celu oddzielenie tej biomasy od oczyszczonych ścieków. W procesie osadu czynnego główną rolę odgrywają powstające w wyniku biologicznej flokulacji zooglealne skupiska mikroorganizmów (kłaczkki). Skupiska te składają się z komórek bakteryjnych, pozakomórkowych biopolimerów, wody oraz cząstek stałych adsorbowanych ze ścieków. Kłaczkki osadu czynnego są ważnym przedmiotem badań ponieważ ich właściwości fizyczne mają istotny wpływ na transport substratu do wnętrza skupisk, flokulację mikroorganizmów oraz efektywność oddzielania biomasy osadu w osadnikach. Fizyczna charakterystyka kłaczków ma także duże znaczenie dla zagęszczania i odwadniania osadu nadmiernego podczas jego unieszkodliwiania. Obecnie coraz powszechniej uważa się, że wielkości kłaczków i ich struktura są najważniejszymi parametrami fizycznymi decydującymi o właściwym działaniu osadu czynnego.

Struktura kłaczków może być brana pod uwagę jako charakterystyczna cecha odzwierciedlająca warunki operacyjne procesu osadu czynnego, jak również przemiany wewnątrzkomórkowe. Badania tej cechy kłaczków mogą doprowadzić do wyjaśnienia wielu problemów natury biologicznej i fizykochemicznej, a tym samym pozwolą na intensyfikację i optymalizację procesu osadu czynnego. Dotyczy to, np. biologicznego usuwania fosforu, które odbywa się nie tylko w wyniku jego kumulowania w postaci polifosforanów, ale również fizykochemicznego wiązania w osadzie przez jony metali znajdujące się w ściekach (1,2). Sposób i trwałość wiązania fosforu w dużym stopniu zależy od szeroko rozumianej „kondycji fizycznej” kłaczków (3).

Coraz większe wymagania dotyczące oczyszczania ścieków, a w szczególności usuwania pierwiastków biogennych, powodują znaczny stopień skomplikowania układów technologicznych. W systemach osadu czynnego z usu-

waniem azotu i fosforu zachodzi wiele procesów jednostkowych: utlenianie związków organicznych, nityfikacja, denityfikacja i defosfatacja. Procesy te realizowane są przy współdziałaniu różnych populacji mikroorganizmów, które uaktywniają się pod wpływem zmiany warunków środowiskowych — rodzaju i stężenia substratu, obciążenia osadu, ilości rozpuszczonego tlenu, odczynu, itp. Takie stresowe warunki mogą w określony sposób oddziaływać na stosunki ilościowe między poszczególnymi populacjami drobnoustrojów, a w efekcie na stopień dyspersji i strukturę kłaczków.

Szczegółowe poznanie prawidłowości zmian zachodzących w strukturze kłaczków osadu czynnego w różnych warunkach działania systemów biologicznego oczyszczania ścieków, wymaga bardziej specyficznych metod badań morfologicznych niż tylko tradycyjne obserwacje mikroskopowe. W prezentowanej pracy omówiono sposób preparowania, umożliwiającą cięcie kłaczków na bardzo cienkie skrawki (przekroje) za pomocą mikrotomu, bez naruszania ich pierwotnej struktury.

2. Pochodzenie osadu czynnego

Eksperymenty prowadzono na osadach czynnych pobieranych z różnych systemów biologicznego oczyszczania ścieków. Takie postępowanie miało na celu sprawdzenie czy stosowana metodyka jest uniwersalna w odniesieniu do osadów różniących się stanem biochemicznym, składem biocenozy oraz strukturą kłaczków. Źródłem osadu czynnego były następujące układy badawcze:

- a) instalacja doświadczalna dla zintegrowanego usuwania C, N i P typu UCT, zasilana rzeczywistymi ściekami miejskimi,
- b) instalacja doświadczalna typu SBR, zasilana ściekami syntetycznymi na bazie glukozy,
- c) instalacja doświadczalna oczyszczająca ścieki syntetyczne z zawartością substancji powierzchniowo-czynnych,
- d) instalacja doświadczalna do tlenowej stabilizacji osadu.

3. Preparowanie kłaczków

Idea analizowania struktury wewnętrznej kłaczków osadu czynnego przy wykorzystaniu techniki mikrotomowej została zapożyczona z histologii, dziedziny medycyny zajmującej się badaniami tkanek ludzkich i zwierzęcych. Próbkę materiału biologicznego przeznaczone do cięcia w mikrotomie wymagają wstępnego przygotowania, obejmującego ich chemiczne utrwalanie i utwardzanie. W biotechnologii środowiskowej technika ta była dotąd kilkukrotnie zastosowana do badania budowy biofilmu tworzącego się na złożach biologicznych (4-6). Udana próba w odniesieniu do kłaczków osadu czynnego przeprowadzono na Uniwersytecie w Toronto (7), gdzie korzystano z kosztownej, specjalistycznej aparatury. Operacje związane z obróbką che-

miczną kłaczków były w większości wykonywane automatycznie za pomocą histomatycznego procesora tkankowego (model 266, Fisher Scientific Co.).

W porównaniu z tkankami, a nawet biofilmem bakteryjnym, kłaczkosady są tworem znacznie bardziej nietrwałym, ze względu na ich duże uwodnienie, dochodzące do 95%. Wymaga to szczególnego podejścia, aby w trakcie preparowania nie zmienić ich wewnętrznej struktury. Ze względu na delikatną budowę kłaczków, bardzo istotny jest również sposób pobierania próbek z bioreaktora. W podanej metodzie nie stosowano specjalistycznej aparatury w trakcie chemicznej obróbki kłaczków. Cała procedura preparowania kłaczków do badań struktury wewnętrznej składała się z następujących etapów:

- pobieranie próbek osadu,
- przygotowanie i zestalanie kłaczków,
- cięcie za pomocą mikrotomu,
- wybarwianie preparatów.

3.1. Pobieranie próbek osadu

Osad czynny pobierany był z poszczególnych bioreaktorów za pomocą pipety o szerokim otworze (4 mm średnicy). Zapobiegano w ten sposób możliwości rozbijania i deformowania kłaczków, a tym samym zachodzeniu zmian w ich strukturze podczas przepływu do środka pipety. Tego rodzaju pipety stosuje się przy pomiarach geometrycznych cech kłaczków i rozkładów ich wielkości (8-10).

3.2. Przygotowanie i zestalanie kłaczków

Procesy przygotowania i zestalania kłaczków były najbardziej pracochłonnymi operacjami. Obejmowały: utrwalanie kłaczków w formalinie, odwadnianie alkoholem, czyszczenie acetonem i ksylenem, oraz impregnację w parafinie.

Próbkę osadu o objętości 2 cm³ przenoszono na sączek w celu wstępnego odciążenia wody, a następnie ostrożnie spłukiwano 10% roztworem formaliny do małej zlewki o pojemności 20 cm³. Zawartość zlewki wytrząsano przez 1 godzinę, przy czym intensywność wytrząsania dobierano tak, aby nie powodować rozbijania kłaczków. Formalina spełnia rolę czynnika utrwalającego, który penetrując do wnętrza kłaczków zabija komórki mikroorganizmów, a jednocześnie konserwuje i utwardza jego różne części składowe.

W prezentowanej metodzie uwzględniono również możliwość przechowywania kłaczków (po utrwaleniu ich formaliną) przez pewien czas, przed przystąpieniem do dalszej obróbki chemicznej. W większości przypadków korzystne jest bowiem zebranie kilku próbek osadu, a następnie ich jednoczesne dalsze preparowanie oraz cięcie. W tym celu przenoszono kłaczkosady z formaliny na bibułę, odsączano, spłukiwano wodą destylowaną do małej zlewki i ostrożnie wytrząsano przez 0,5 godziny, zmieniając co 10 minut wodę. Po odciążeniu nadmiaru wody na sączku, kłaczkosady spłukiwano do niewielkiej formy, wcześniej przygotowanym oraz wysterylizowanym w autoklawie 1,5%

roztworem agaru Difco i wstawiano do lodówki. Po zestaleniu, otrzymany bloczek agarowy zalewano wodą destylowaną i przechowywano w temperaturze 4°C. Zgodnie z obserwacjami Gańczarczyka i in. (11), kłaczki osadu zabezpieczone w podobny sposób mogą być przechowywane w podanych warunkach, nawet ponad 7 dni bez widocznej zmiany ich morfologii.

Do dalszej obróbki odcinano zbędne, zewnętrzne części bloczka tak, aby uzyskać możliwie małe jego fragmenty zawierające zatopione kłaczki. Odwadnianie, mające na celu usunięcie związanej w kłaczkach wody, wykonywano poprzez kilkukrotne umieszczanie preparatów w roztworach alkoholu etylowego o wzrastającej procentowości (od 50 do 100%). W kolejnej operacji oczyszczano preparaty z resztek etanolu poprzez przemywanie acetonem, a następnie ksylenem. Po odwodnieniu i oczyszczeniu prowadzono impregnację w ciekłej parafinie o temperaturze 56°C. W czasie tego procesu następowała penetracja parafiny do wnętrza kłaczek oraz ich zestalenie w bloczku parafinowym utwardzanym w temperaturze pokojowej. W ten sposób uzyskiwano trwałe preparaty, nie zmieniające swoich właściwości i nadające się do cięcia w mikrotomie.

Harmonogram poszczególnych operacji oraz wykaz stosowanych reagentów przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1
HARMONOGRAM OPERACJI PRZYGOTOWANIA I ZESTALANIA KLACZKÓW

Faza	Operacja	Czas (h)	Roztwór	Stężenie (%)
1	utrwalanie	1	formalina	10
2	plukanie	1/6	woda destylowana	1,5
	plukanie	1/6	woda destylowana	
	plukanie	1/6	woda destylowana	
	zabezpieczanie	0.5	agar	
3	odwadnianie	1	alkohol	50
	odwadnianie	2	alkohol	70
	odwadnianie	2	alkohol	80
	odwadnianie	18	alkohol	96
	odwadnianie	1/3	alkohol	100
	odwadnianie	1/3	alkohol	100
	odwadnianie	1	alkohol	100
4	czyszczenie	1/3	aceton	
	czyszczenie	2/3	ksylen	
	czyszczenie	2/3	ksylen	
	czyszczenie	2/3	ksylen	
5	impregnacja	1	parafina	
	impregnacja	1	parafina	

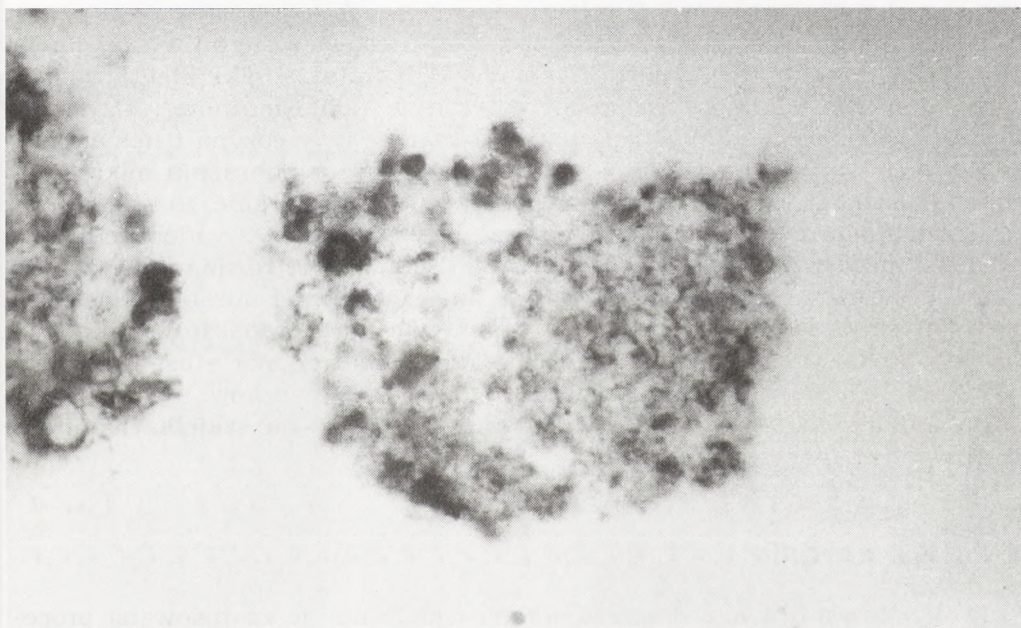
3.3. Cięcie za pomocą mikrotomu

Preparaty parafinowe (bloczki) były cięte w mikrotomie na skrawki o grubości 7 μm . Podczas tej operacji nie występowała żadna deformacja zestalonych kłaczków. Do dalszej obróbki poszczególne przekroje umieszczane były na mikroskopowych szkiełkach podstawowych. Ponieważ w trakcie cięcia bloczków trudno jest ocenić, które przekroje będą później najbardziej interesujące, dlatego z każdego preparatu należy uzyskać od kilku do kilkunastu fragmentów.

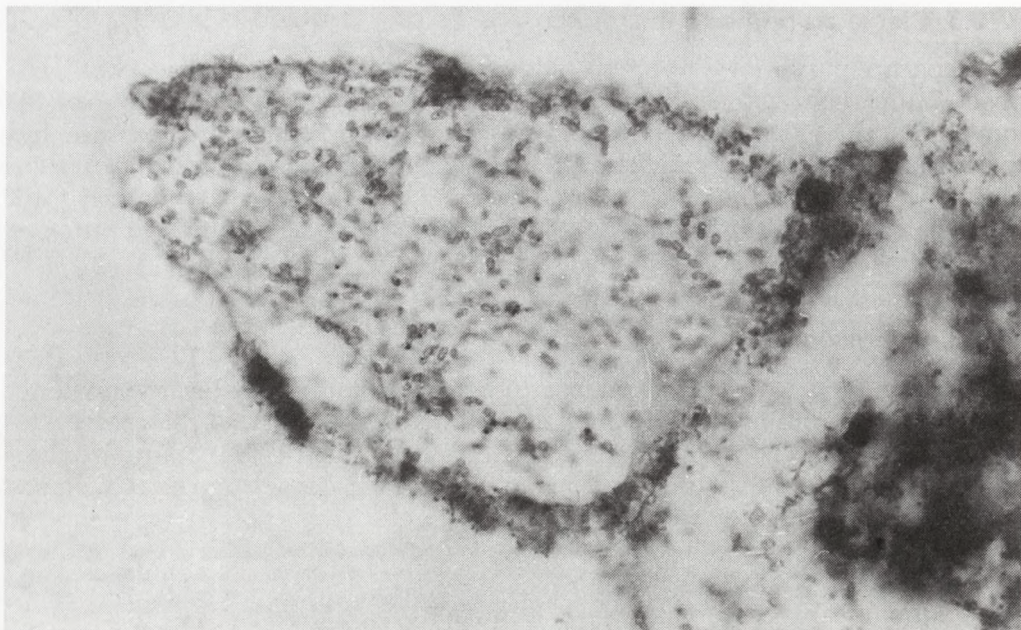
3.4. Wybarwianie preparatów

Uzyskane przekroje kłaczków osadu czynnego muszą zostać wybarwione, ponieważ ich minimalna grubość powoduje, że są niemal przezroczyste. W tym celu pocięte i naniesione na szkiełko mikroskopowe preparaty należy odparafinować. Zabieg ten prowadzono według określonej procedury, stosując kolejno:

- ksylen 1
- ksylen 2
- sumaryczny czas działania 5 minut;
- 96% - 90% - 80% - 70% - 50% roztwór alkoholu etylowego,
- sumaryczny czas działania 3 minuty.



Ryc. 1. Mikrotomowy przekrój kłaczków osadu czynnego z laboratoryjnej instalacji typu SBR; 1 cm = 35 μm .



Ryc. 2. Mikrotomowy przekrój kłaczką osadu czynnego z laboratoryjnej instalacji typu A/O; 1 cm = 13 μ m.

Po spłukaniu wodą destylowaną preparaty nadawały się do wybarwienia. W zależności od potrzeb można wybarwiać różne składniki kłaczków, np. bakterie, pozakomórkowe biopolimery, granule polifosforanowe. Uzyskane w prezentowanych badaniach preparaty barwione były eozyną i hematoksyliną (ryc. 1,2). Wybarwione części przekrojów kłaczków obrazują mikroorganizmy i pozakomórkowe biopolimery. Obszary nie wybarwione, to wolne przestrzenie zajmowane normalnie przez wodę (7). Na rycinie 2 widoczne są pojedyncze mikroorganizmy oraz kolonie kilku komórek o rozmiarach od 1 do 4 μ m. Prowadzone eksperymenty miały na celu głównie obróbkę kłaczków, pozwalającą na ich cięcie i przygotowywanie trwałych preparatów mikroskopowych do obserwacji struktury wewnętrznej. Dlatego nie stosowano specyficznego wybarwienia poszczególnych składników kłaczków.

Po wybarwieniu, preparaty były trwale mocowane na szkiełkach mikroskopowych za pomocą cedaxu.

4. Podsumowanie

W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że zastosowana procedura preparowania i sekcjonowania kłaczków pozwala na efektywne badania ich struktury wewnętrznej, niezależnie od źródła pochodzenia osadu czynnego. Podczas cięcia w mikrotomie nie występowała deformacja zestalonych

w parafinie kłaczków. Uzyskane trwałe preparaty mogą być obserwowane i fotografowane pod mikroskopem lub badane przy wykorzystaniu systemów analizy obrazu.

W przedstawionej metodzie szczególnie ważne jest, aby na każdym etapie procedury poczynając od pobierania próbek osadu, zachować dużą ostrożność ze względu na delikatną budowę kłaczków. Niedogodnością jest również pracochłonność metody i konieczność pewnego doświadczenia podczas jej stosowania. Dalszy postęp biotechnologii środowiskowej w odniesieniu do procesu osadu czynnego stwarza jednak konieczność wprowadzania bardzo specyficznych i często skomplikowanych metod badawczych. Wydaje się natomiast, że niektóre czynności można będzie w przyszłości uprościć. Istnieje także możliwość zastąpienia parafiny metakrylanami.

W prezentowanych testach nie stosowano specyficznego wybarwienia poszczególnych składników kłaczków. Jest to jednak (poza niskimi kosztami) podstawowa zaleta tej metody, pozwalająca na analizowanie rozmieszczenia i wzajemnych relacji między tymi składnikami. Ponadto badanie kolejnych mikrotomowych przekrojów tych samych kłaczków umożliwi niemal przestrzenną analizę ich struktury wewnętrznej. Odnosi się to jednak do kłaczków o stosunkowo dużych wymiarach.

Zastosowanie techniki mikrotomowej pozwala na szczegółowe badanie morfologii kłaczków oraz zmian strukturalnych zachodzących w różnych warunkach środowiskowych. Badania te umożliwią rozszerzenie wiedzy dotyczącej m.in. formowania i rozpadu kłaczków osadu czynnego, a także mechanizmu uwalniania fosforu z biomasy w procesach biologicznej defosfatacji.

Literatura

1. Röske I., Schönborn C., (1994), *Wat. Res.*, 28, 1103-1109.
2. Kurbiel J., Rybicki S. M., (1994), *O współczesnych kierunkach rozwojowych usuwania fosforu ze ścieków i ich wpływie na problem osadów ściekowych*, Mat. Konf. „Nowe rozwiązania w technologii oczyszczania ścieków i przeróbce osadów”, Ustroń.
3. Barbusiński K., Kościelniak H., (1995), *Znaczenie fizycznej struktury osadu czynnego w procesie biologicznego usuwania fosforu*, Mat. Konf. „Eksploracja oczyszczalni ścieków”, Cędzyna.
4. Drury W. J., Characklis W. G., Stewart P. S., (1993), *Wat. Res.*, 27, 1119-1126.
5. Zhang T. C., Bishop P. L., (1993), *Structure, activity, and composition of biofilms*, First International Specialized Conference on „Microorganisms in activated sludge and bio-film processes”, Paris, 303-312.
6. Zahid W. M., Ganczarzyk J. J., (1994), *Wat. Env. Res.*, 66, 100-106.
7. Li D. H., Ganczarzyk J. J., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 57-65.
8. Sezgin M., Jenkins D., Parker D. S., (1978), *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 50, 362-381.
9. Li D. H., Ganczarzyk J. J., (1987), *Wat. Res.*, 21, 257-262.
10. Barbusiński K., Kościelniak H., (1995), *Wat. Res.*, 29, 1703-1710.
11. Ganczarzyk J. J., Zahid W. M., Li D. H., (1992), *Wat. Res.*, 26, 1695-1699.

Autorzy pragną podziękować Pani dr Stefanii Grucy z Zakładu Biologii Nowotworów Centrum Onkologii w Gliwicach za udzieloną pomoc w wykonaniu badań.

Preparation of activated sludge flocs to study their internal structure

Summary

A procedure for the preparation of activated sludge flocs to study their internal structure was presented. Sludge samples were stabilized, embedded in paraffin and sliced with a microtome into sections 7 μm thick. The microtome sections were stained with hematoxylin eosin. Direct microscopic observations of these sections proved that the micro-slicing technique employed in this study may be a useful tool in the evaluation of the internal floc structure.

Key words:

activated sludge flocs, internal structure, embedding in paraffin, microtome sectioning.

Adres do korespondencji:

Krzysztof Barbusiński, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki,
Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18, 44-100 Gliwice.