

*tlenowy osad granulowany, polimery zewnątrzkomórkowe,
metoda żywic jonowymiennych,
obciążenie biomasy ładunkiem zanieczyszczeń*

Paulina RUSANOWSKA, Agnieszka CYDZIK-KWIATKOWSKA,
Irena WOJNOWSKA-BARYŁA, Edyta KORSAK*

ZAWARTOŚĆ POLIMERÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH W TLENOWYM OSADZIE GRANULOWANYM

Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) odgrywają kluczową rolę w formowaniu złożonych struktur mikroorganizmów w systemach oczyszczania ścieków. W pracy omówiono wpływ EPS na podstawowe właściwości fizyko-chemiczne granul tlenowych. Opisano znane metody izolacji polimerów zewnątrzkomórkowych, określając jednocześnie przydatność dwóch z nich: izolacji za pomocą żywic jonowymiennych oraz sonikacji. W badaniach określono wpływ obciążenia biomasy ładunkiem związków organicznych na zawartość i skład EPS w granulach tlenowych.

1. WSTĘP

Polimery zewnątrzkomórkowe (EPS) są związkami wielkocząsteczkowymi syntezowanymi przez komórki mikroorganizmów. Odgrywają kluczową rolę w formowaniu biocenozy technicznych w systemach oczyszczania ścieków. Udział EPS w strukturze konsorcjów mikroorganizmów decyduje ich o morfologii, wytrzymałości oraz właściwościach sedymentacyjnych. EPS znajdują się na powierzchni komórek bakteryjnych, których skład zależy od wydzielania zewnątrzkomórkowego, ścierania z powierzchni komórek, lizy i wchłaniania substancji z otoczenia przez bakterie. EPS składają się z egzoprotein (PN), egzopolisacharydów (PS), glikoprotein, kwasów huminowych, lipidów oraz kwasów nukleinowych [5]. EPS sprzyjają adhezji komórek bakteryjnych do powierzchni i ich agregacji, zapewniają także ochronę komórek przed zmianami warunków środowiskowych. Obecność EPS ułatwia sorpcję i akumulację substancji zapasowych. Wchodzące w skład EPS łatwo dostępne związki węgla mogą być wykorzystywane przez mikroorganizmy w warunkach głodu. Ponadto EPS zapewniają ochronę komórek bakteryjnych przed substancjami toksycznymi, które występują w ściekach.

* Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska, ul. Słoneczna 45G, 10-709 Olsztyn, paulina.jaranowska@uwm.edu.pl.

Charakterystyka EPS wymaga izolacji EPS z próbek biomasy a następnie analizy ekstraktów. Ilość wyizolowanych EPS zależy od metody ekstrakcji. Izolacja EPS jest często klasyfikowana jako fizyczna bądź chemiczna. Celem fizycznych metod (wirowanie, sonikacja, ogrzewanie) jest oderwanie EPS od komórek siłami fizycznymi. Chemiczne metody wymagają użycia związków silnie zasadowych bądź kwaśnych, EDTA, formaldehydu, które destabilizują sieci EPS przez modyfikację molekuł ją podtrzymujących. Chemiczne metody mogą zaburzać wynik ekstrakcji, są często w stanie wyizolować jeden z komponentów EPS, jednak często wpływają negatywnie na inne komponenty. Metody chemiczne izolacji EPS są jednak powszechnie stosowane [7]. Stosowane są protokoły integrujące metody z obu kategorii i przez niektórych autorów uznawane są za najbardziej efektywne. Nie istnieje obecnie standardowa procedura izolacji EPS, co powoduje że interpretacja i porównywanie wyników jest trudne.

Jednym z typów biomasy o wysokiej zawartości polimerów zewnątrzkomórkowych są granule hodowane w warunkach tlenowych. Badania wskazują, że struktura granul tlenowych zawiera wielokrotnie więcej EPS-ów niż osad czynny [12]. Tlenowy osad granulowany wykształca się w odpowiedzi na specyficzne warunki hydrauliczno-dynamiczne w reaktorze takie jak, turbulentny ruch ścieków, krótki czas oddzielania granul od fazy ciekłej, długość cyklu pracy reaktora (najczęściej od 6 do 12 h). Główne zalety technologii granul tlenowych to możliwość utrzymania wysokiego stężenia biomasy w reaktorach, łatwość oddzielania biomasy od ścieków oczyszczonych oraz możliwość symultanicznego usuwania związków węgla, azotu i fosforu wynikająca z różnych warunków tlenowych w poszczególnych warstwach granul. Mikrostruktura granul tlenowych oraz zróżnicowanie gatunkowe są ściśle związane z rodzajem zastosowanego źródła węgla [8]. Stężenie organicznych związków węglowych w ściekach dopływających do reaktora jest istotnym parametrem eksploatacyjnym w systemach oczyszczania ścieków. Obciążenie biomasy ładunkiem związków organicznych determinuje stabilność i morfologię powstających granul [2,4,11]. Lopez i in. 2009 [9] hodowali granule przy obciążeniach biomasy ładunkiem zanieczyszczeń od 2,7 do 22,5 kg COD/(m³·d), wskazując, że rozmiar granul zmniejsza się wraz z obniżaniem obciążenia biomasy ładunkiem związków organicznych. Wysokie wartości obciążenia biomasy ładunkiem związków organicznych powodują rozpad osadu granulowanego i wymywanie biomasy z reaktora.

Cuervo-López i in. 1999 [3] wskazuje, że egzoproteiny (PN) odgrywają główną rolę w formowaniu i stabilizacji osadu granulowanego. Autorzy wykazali, że ilość egzoprotein była wyższa, gdy źródłem węgla była glukoza oraz mleczan, w porównaniu z octanem. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Adav i in. 2008 [1] poddali hydrolizie komponenty EPS i wykazali, że działanie enzymów hydrolizujących egzoproteiny miało niewielki wpływ na stabilność granul, dopiero hydroliza β -polisacharydów spowodowała rozpad granul. Autorzy wskazują, że to polisacharydy, w szczególności β -polisacharydy, są niezbędnym składnikiem trwałych granul, tworząc szkielet na którym osadzają się białka, lipidy, α -polisacharydy oraz komórki. Zhu i in. 2012 [14] wskazują, że stosunek PN/PS nie tylko decyduje o formowaniu granul, ale również o właściwościach sedymentacyjnych

biomasy. Autorzy wykazali, że ilość PN w granuli zwiększa hydrofobowość, która zapewnia tworzenie zwartych i stabilnych szybko opadających granul. Brak jest w literaturze wyczerpujących danych dotyczących wpływu stężenia organicznych związków węglowych w ściekach na zawartość EPS w granulach tlenowych. Nie ma również jednoznacznych danych odnośnie wyboru metod izolacji EPS z tego typu biomasy.

Celem pracy było określenie wpływu organicznych związków węglowych w ściekach o niskim stosunku ChZT/N i wysokiej zawartości azotu amonowego na ilość i skład polimerów zewnątrzkomórkowych w granulach tlenowych. W badaniach porównano dwie metody izolacji EPS z granul tlenowych: zmodyfikowaną metodę sonikacji z ekstrakcją formaldehydem (metoda łącząca fizyczną i chemiczną ekstrakcję) oraz metodę żywic jonowymiennych.

2. METODYKA

Analizowano próbki biomasy pobranej z 3 reaktorów porcjowych różniących się dawką organicznego źródła węgla (R1–300 mg/dm³, R2–500 mg/dm³, R3–700 mg/dm³). Reaktory pracowały w 8-godzinnych cyklach. Każdy cykl składał się z faz: napełniania, anoksydacyjnej, napowietrzania, sedymentacji i spustu. W reaktorach fazy napełnienia i spustu trwały 3 minuty, natomiast faza sedymentacji 2 minuty. Na początku cyklu pracy reaktorów występowała 45-minutowa faza anoksydacyjna. Reaktory pracowały w temperaturze 26°C. Stopień wymiany objętościowej ścieków wyniósł 62,5%/cykl, a hydrauliczny czas zatrzymania ścieków 12,8 h. Do reaktorów wprowadzano wody nadosadowe wydzielone podczas odwadniania przefermentowanych osadów ściekowych w Miejskiej Oczyszczalni „Łyna” w Olsztynie. Wody nadosadowe charakteryzowały się wskaźnikami zanieczyszczeń: 119 ± 53 mg ChZT/dm³, 263 ± 36 mg NH₄⁺-N/dm³, 273 ± 42 mg N/dm³. Do wód nadosadowych dodawano węglan i wodorowęglan sodu.

Oznaczenie polimerów zewnątrzkomórkowych metodą sonikacji wykonano zgodnie z metodyką zaproponowaną przez Zhang i in. 1999 [13]. Pobrano 4 ml biomasy i uzupełniono wodą destylowaną do objętości 10 ml. Próbkę homogenizowano dezintegratorem ultradźwiękowym przez 1 min przy amplitudzie drgań 30%. Pobrano 5 ml zhomogenizowanej biomasy do próbówki wirówkowej, uzupełniono do 25 ml wodą destylowaną i odwirowano (3500 obr./min, 10 min). Ciecz nadosadową dekantowano do próbówki o pojemności 50 cm³. Do pozostałej po wirowaniu biomasy dodano 25 cm³ 8,5% roztworu NaCl, zawierającego 0,22% formaldehydu. Następnie próbkę worteksowano przez 1 min i odwirowano (3500 obr./min, 10 min). Ciecz nadosadową ponownie dekantowano i dodano do zebranego supernatantu. Uzyskaną mieszaninę uzupełniano wodą destylowaną do 50 cm³. Do nowej próbówki wirówkowej odmierzone 10 ml uzyskanego supernatantu i próbówkę odwirowano (12000 obr./min, 30 min.). Supernatant sączono przez filtr celulozowo-octanowy o średnicy porów 0,22 μm w celu usunięcia z cieczy komórek bakteryj-

nych (filtracja podciśnieniowa). Stężenie EPS w przesączu oznaczono wagowo. Do wyprażonego tygielka odmierzonego 10 cm³ przesączonej próbki cieczy, odparowano na łaźni wodnej, wysuszono w suszarce (105 °C; 1,5 h), spalono w piecu muflowym, a następnie tygielek zważono.

Drugą metodą izolacji EPS była metoda z zastosowaniem żywic jonowymiennych. EPS ekstrahowano na żywicy kationitowej jonowymiennej Dowex 50x8 (Sigma Aldrich) [5]. Przed przystąpieniem do ekstrakcji, żywicę przez 1 h płukano w 150 ml PBS (9 mM NaCl, 1 mM KCl, 2 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 4 mM KH₂PO₄) w kąpiel lodowej. Następnie przefiltrowano. Próbkę biomasy homogenizowano przez 4 min., następnie chłodzono na lodzie. Do zhomogenizowanej 0,5 g próbki biomasy dodano 35 g żywicy jonowymiennej. Równocześnie wykonano próbkę zerową (żywica kationowymienna i bufor PBS). Próbki mieszano w ciemności (800 obr./min.) przez 4 h na lodzie, a następnie sedymentowano. Supernatant przenoszono do 50 cm³ próbek i wirowano dwukrotnie (15 min, 12000 obr./min., 4°C). Stężenie EPS w supernatancie oznaczono wagowo.

W ekstraktach uzyskanych obiema metodami oznaczono polisacharydy i białka. Polisacharydy zostały oznaczone metodą Gerhardt i in. 1994 w odniesieniu do mg glukozy/l [6]. Odczynniki przygotowywano w dniu oznaczeń. W celu przygotowania odczynnika antronowego odmierzonego 0,5 g antronu, dodano 5 cm³ 99,8% alkoholu, całość wymieszano i uzupełniono alkoholem do 10 ml. Uzyskany roztwór przenoszono do zlewki i uzupełniono 75% H₂SO₄ do końcowej objętości 250 cm³. W celu wykonania oznaczenia pobrano 1 ml próbki, dodano do niej 2 ml 75% H₂SO₄ i wymieszano. Dodano 4 ml odczynnika antronowego i ponownie wymieszano. Próbkę umieszczono na bloku grzewczym (100°C) i gotowano przez 15 min., następnie ostudzono do temperatury pokojowej i zmierzono absorbancję przy długości fali 578 nm, w odniesieniu do wody destylowanej z odczynnikiem.

Białka zostały oznaczone metodą Lowry'ego [10] przy pomocy krzywej wzorcowej roztworów albuminy wołowej (BSA). W celu oznaczenia ilości białek przygotowano trzy odczynniki. Pierwszy zawierał 143 mM NaOH i 270 mM Na₂CO₃, drugi 57 mM CaSO₄, a trzeci 124 mM C₄H₄Na₂O₆ (Sigma Aldrich). Odczynniki zmieszano w proporcji 100:1:1 uzyskując tzw. mieszaninę odczynników. Dodatkowo przygotowano odczynnik Folina (Sigma Aldrich) rozcieńczając w wodzie destylowanej w stosunku 5:6. W celu wykonania oznaczenia do 0,5 cm³ próbki dodano 0,7 cm³ mieszaniny odczynników, całość wymieszano i inkubowano 20 min. w ciemności. Następnie dodano 0,1 cm³ odczynnika Folina i wymieszano. Po 30 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej wyniki oznaczono przy pomocy spektrofotometru (Biophotometer Eppendorf).

3. WYNIKI

W pracy porównano efektywność izolacji EPS z tlenowego osadu granulowanego metodą z wykorzystaniem żywic jonowymiennych oraz sonikacji. W reaktorach obserwowano wysoką średnią efektywność usuwania ChZT z wód nadosadowych, która wzrastała ze wzrostem dawki zewnętrznego źródła węgla i w reaktorze R1 wyniosła 72%, w reaktorze R2 – 82%, a w reaktorze R3 – 86%. Ilość biomasy w R1, R2, R3 wynosiła odpowiednio $8,1 \pm 1,3$, $9,5 \pm 1,5$, $12,9 \pm 1,8$ g s.m./dm³. Frakcja organiczna w biomacie stanowiła około 70%.

Ilość uzyskanego EPS po izolacji metodą sonikacji przewyższała ilości EPS otrzymane metodą żywic jonowymiennych (tab. 1). Duża różnica wynikała przede wszystkim z wysokiego udziału cukrów w całkowitej ilości EPS izolowanych metodą sonikacji. Wysoka zawartość polisacharydów uzyskana w próbkach po metodzie sonikacji może wynikać z dodatku formaldehydu w trakcie izolacji. Aldehydy wchodzi w reakcję z odczynnikiem antronym zmniejszając wiarygodność uzyskiwanych odczytów. Dodatek formaldehydu dodatkowo powoduje denaturację strukturalną i enzymatyczną białek, co wpływa na uzyskiwane odczyty spektrofotometryczne. Z tego powodu stosunek białek do cukrów (PN/PS) uzyskany w próbkach izolowanych metodą sonikacji był bliski zera. W przypadku izolacji metodą żywic jonowymiennych stosunek PN/PS wynosił około 8–11.

Tabela 1. Ilość EPS, białek, cukrów oraz stosunek PN/PS w próbkach biomasy granulowanej uzyskanych w wyniku izolacji metodą żywic jonowymiennych oraz sonikacji

	Żyvice jonowymiennie				Sonikacja			
	EPS mg/g	Białka mg/g	Cukry mg/g	PN/PS	EPS mg/g	Białka mg/g	Cukry mg/g	PN/PS
R1	29,8	25,0	$3,1 \pm 0,4$	8,1	639,5	3,0	$67,6 \pm 0,1$	0,04
R2	45,0	39,4	$4,2 \pm 0,5$	11,8	902,1	4,6	$70,4 \pm 0,1$	0,07
R3	46,9	23,5	$2,4 \pm 0,2$	9,8	581,4	1,9	$213,2 \pm 0,2$	0,01

Wyniki izolacji EPS metodą żywic jonowymiennych wskazują, że najwięcej EPS było w biomacie z reaktora eksploatowanego przy wyższym obciążeniu biomasy ładunkiem związków organicznych. W tych warunkach technologicznych, w wyniku nadmiaru związków organicznych bakterie gromadziły EPS substancje zapasowe. Przy niższym obciążeniu większość węgla organicznego była wykorzystywana jako źródło energii przez bakterie. Najwięcej białek i cukrów występowało w biomacie, gdy do reaktora dozowano zewnętrzne źródło węgla w ilości 500 mg/dm³.

4. PODSUMOWANIE

Dostępne w literaturze metodyki pozwalają izolować EPS różnymi metodami. Część metod jest wiarygodna, natomiast niektóre są obarczone błędem wynikającym np. z wykorzystanych w analizie odczynników wpływających na uzyskiwane rezultaty. W badaniach wykazano, że metoda sonikacji w połączeniu z ekstrakcją formaldehydem wpływa na wyniki. Metodą żywic jonowymiennych nie uzyskano wysokiej efektywności izolacji EPS, lecz metoda jest wiarygodna i dokładna. Metoda ta nie wymaga stosowania odczynników chemicznych, które mogłyby wpływać na wyniki izolacji. Metodą żywic jonowymiennych wykazano, że w warunkach oczyszczania ścieków o niskim stosunku ChZT/N przez tlenowy osad granulowany wraz ze wzrostem obciążenia ładunkiem związków organicznych następuje wzrost produkcji EPS. Stosunek białek do cukrów w reaktorze, do którego dozowano 500 mg/l był najwyższy co wskazuje, że granule tlenowe charakteryzowały się wysoką trwałością i dobrymi właściwościami sedymentacyjnymi.

Badania były finansowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki o numerze 2013/11/N/NZ9/04568 oraz w ramach badań statutowych 18.610.006-300.

LITERATURA

- [1] ADAV S., LEE D.-J., TAY J.-H., *Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule*, Water Research, 2008, Vol. 42, 1644–1650.
- [2] ARROJO B. *Advanced systems for biological treatment of high nitrogen-loaded wastewater*, Praca doktorska. Uniwersytet Santiago de Compostela 2007.
- [3] CUERVO-LÓPEZ F.M. MARTINEZ F., GUTIÉRREZ-ROJAS M., NOYOLA R.A., GÓMEZ J., *Effect of nitrogen loading rate and carbon source on denitrification and sludge settleability in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) Reactors*, Water Science and Technology, 1999, Vol. 40, No. 8, 123–130.
- [4] DE KREUK M.K., PICIOREANU C., HOSSEINI M., XAVIER J.B., VAN LOOSDRECHT M.C.M., *Kinetic model of granular sludge SBR – Influeces on nutrient removal*, Biotechnology and Bioengineering, 2007, Vol. 97, No. 4, 801–815.
- [5] FRØLUND B., RIKKE P., KEIDING K., NIELSEN P.H., *Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin*, Water Research, 1996, Vol. 30, No. 8, 1749–1758.
- [6] GERHARDT P., MURRAY R.G.E., WOOD W.A., KRIEG N.R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, 1994, ASM. 1-55581-048-9:518.
- [7] LIU H., FANG H., *Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges*, Journal of Biotechnology, 2002, Vol. 95, 249–256.
- [8] LIU Y., TAY J.H., *State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment*, Biotechnology Advances, 2004, Vol. 22, No. 7, 533–563.
- [9] LOPEZ A., DOSTA J., MATA-ALVAREX J., *Start-up of an aerobic granular sequencing batch reactor for the treatment of winery wastewater*, Water Science and Technology, 2009, Vol. 46, 520–525.

- [10] LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., *Protein measurement with the Folin Phenol Reagent*, Journal of Biological Chemistry, 1951, Vol. 193, 265–275.
- [11] MCSWAIN B.S., IRVINE R.L., WILDERER P.A., *The influence of settling time on the formation of aerobic granules*, Water Science and Technology, 2004, Vol. 50, 195–202.
- [12] MCSWAIN B.S., IRVINE R.L., HAUSNER M., WILDERER P.A., *Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, Vol. 71, No. 2, 1051–1057.
- [13] ZHANG X., BISHOP P.L., KINKLE B.K., *Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms*, Water Science and Technology, 1999, Vol. 39, No. 7, 211–218.
- [14] ZHU L., LV M.-I., DAI X., YU Y., QI H., XU X., *Role and significance of polymeric substances on property of aerobic granule*, Bioresource Technology, 2012, Vol. 107, 46–54.

EXTRACELLULAR POLYMERS CONTENT IN AEROBIC GRANULAR SLUDGE

Extracellular polymers (EPS) are macromolecular compounds secreted by the microorganisms and play a key role in the formation of technical biocenosis in wastewater treatment systems. Aerobic granules are type of biomass with high content of EPS. The concentration of organic carbon compounds in the wastewater fed into the reactor is an important operational parameter, which influence the morphology and stability of aerobic granules. The aim of this study was to determine the effect of organic carbon load in wastewater with a low COD/N and high content of ammonia nitrogen on the amount and composition of EPS in aerobic granules. The key in assessing the content of EPS is the selection of the appropriate method of isolation. The study compared two isolation methods from aerobic granules: a modified sonication method with formaldehyde extraction and the cation exchange resins (CER). Results show that the formaldehyde used in sonication method influence the obtained results. CER remains reliable and accurate method. The results obtained with CER show an increase in EPS production by aerobic granules with increase in organic carbon load. The ratio of proteins to sugars was the highest in biomass from reactor were 500 mg/L of organic carbon was dosed, indicating that granules in this reactor were characterized by high stability and good sedimentation properties.