

Oznaczenie aktywności metanogennej osadu oraz toksyczności metoksychloru w środowisku beztlenowym

Małgorzata Cimochowicz-Rybicka

Jerzy Kurbiel

Instytut Zaopatrzenia w Wodę

i Ochrony Środowiska

Politechnika Krakowska

1. Wstęp

Metanogenna aktywność osadu określa zdolność osadu z procesu beztlenowego do przemiany rozpuszczonych związków organicznych w metan i dwutlenek węgla.

Badania testowe aktywności metanogennej osadu mogą być zastosowane do określenia optymalnego obciążenia substancjami organicznymi reaktorów z beztlenowym osadem czynnym w celu szybszego i skutecznego ich wpracowania. Analizy te można również wykorzystać do kontroli pracy komór fermentacyjnych.

Zastosowanie testów na aktywność metanogenną osadu wraz z testami toksyczności daje możliwość określenia inhibującego wpływu trudno rozkładalnych i niebezpiecznych substancji toksycznych.

W ostatnich latach w literaturze podaje się wiele przykładów (1,2) nowoczesnych technik laboratoryjnych, stosowanych w badaniach nad aktywnością metanogenną osadów beztlenowych oraz toksycznością różnych związków chemicznych. Zarówno te prostsze jak i bardziej skomplikowane metody badań testowych są stale dyskutowane i weryfikowane.

W artykule tym przedstawiono badania, za pomocą testów porcjowych, aktywności metanogennej osadu z reaktora typu UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) oraz toksyczności metoksychloru-pestycydu z grupy insektycydów chlorowc pochodnych inhibującego aktywność osadu.

2. Cel badań

Celem badań było:

- określenie specyficznej aktywności metanogennej osadu pochodzącego z laboratoryjnego modelu reaktora UASB,
- określenie inhibującego wpływu metoksychloru na badany osad.

3. Metodyka badań aktywności metanogennej osadu z procesu beztlenowego i hamującego wpływu metoksychloru

3.1. Zakres badań

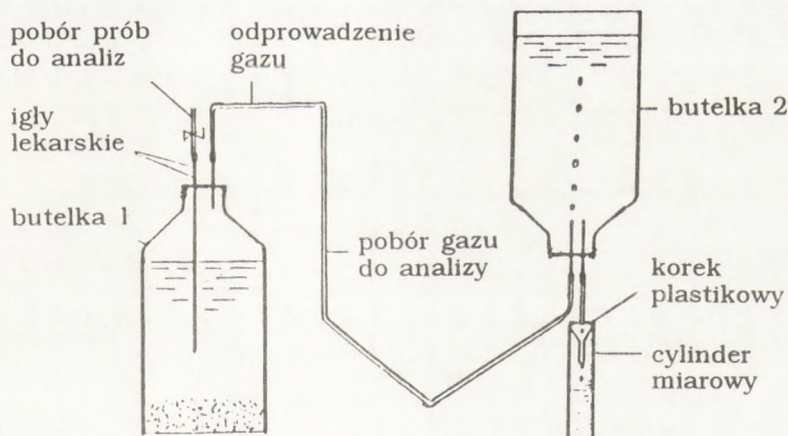
W badaniach zastosowano 2 rodzaje testów porcjowych: 1) na określenie specyficznej metanogennej aktywności osadu oraz 2) na oznaczenie toksyczności metoksychloru. Za pomocą pierwszego określa się aktywność osadu poprzez oznaczenie ilości kwasu octowego wyznaczonej w g ChZT, z którego wytworzony został metan, w odniesieniu do 1g suchej masy organicznej osadu w ciągu doby. Na podstawie wartości specyficznej aktywności metanogennej osadu oraz jej obniżenia po dodaniu substancji toksycznej wyznaczono procentową wielkość inhibicji metoksychloru.

3.2. Źródło osadu beztlenowego

Do hodowli osadu wykorzystywanego w testach porcjowych używano laboratoryjnego modelu reaktora UASB. Całkowita pojemność reaktora wynosiła 6,4 l. Reaktor wpracowywano na osadzie pochodzącym z komory fermentacyjnej osadnika Imhoffa z miejskiej oczyszczalni ścieków w Myślenicach. Reaktor był zasilany substratem o składzie i stężeniu porównywalnym do pożywki używanej w testach aktywności metanogennej.

3.3. Aparatura doświadczalna

Instalacja doświadczalna składała się z termostatu, w którym umieszczono 2 butelki o pojemności 0,5 l połączone ze sobą za pomocą wężyków silikonowych i igieł lekarskich. Schemat instalacji przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Schemat instalacji doświadczalnej.

Butelka 1. stanowiła komorę reakcyjną, w której znajdował się osad wraz z pożywkami i substratami oraz substancją toksyczną lub bez — w przypadku próbki kontrolnej. Gaz powstający w procesie beztlenowym był transportowany do 2. butelki, w której znajdował się 3% roztwór NaOH. Takie rozwiązanie pozwala na absorpcję H₂S i CO₂, które wchodzi w skład gazu fermentacyjnego. Pozostała objętość gazu (metan) wypierała równoważną sobie ilość cieczy z butelki 2. Ciecz ta ujmowana była w cylindrze miarowym, zamkniętym plastikowym korkiem w celu zabezpieczenia przed stratami cieczy spowodowanymi parowaniem.

3.4. Założenia i warunki prowadzenia badań (3-5)

Temperatura

Temperatura inkubacji prób w przypadku przeprowadzonych badań wynosiła 30 ± 4°C.

Odczyn

Optymalne pH procesu wynosiło 7,2 do 7,5, w badaniach od 7 do 7,9.

Sposób prowadzenia testu

Testy porcjowe aktywności osadu można wykonać w 2 układach: z mieszaniem lub bez mieszania. W przypadku układu z mieszaniem można stosować większe objętości badanych próbek (od 1 do 10 l). Dla układu, w którym nie stosuje się mieszania, objętości próbek są mniejsze i nie przekraczają 0,5 l. Zastosowano układ bez mieszania, a objętości próbek wynosiły 0,5 l.

Skład i stężenie substratów i biomasy

Próby zawierające osad pobrany z reaktora UASB w ilości odpowiadającej 1 – 2 g smo/l zasilane były mieszaniną kwasów tłuszczowych: octowego, propionowego oraz butylowego w stosunku wagowym 73:23:04. Chemiczne zapotrzebowanie tlenu tak przygotowanej mieszaniny kwasów tłuszczowych wynosiło ok. 100 g ChZT/kg. Mieszaninę tę neutralizowano do pH 7,0.

Stężenia substratów i biomasy dla reaktorów porcjowych z mieszaniem i bez mieszania podano w tab. 1.

TABELA 1
STĘŻENIE SUBSTRATÓW I BIOMASY STOSOWANE W TESTACH PORCJOWYCH

Rodzaj układu	Stężenie substratu (kw. tł.) [g/l]	Stężenie biomasy (g smo/l)
z mieszaniem	2 + 4	2 + 5
bez mieszania	3,5 + 4,5	1 + 1,5 (2,4)

Stężenie mieszaniny kwasów tłuszczowych w próbce podczas badań wahało się w granicach od 3,5 do 4,5 g ChZT/l.

Skład i stężenie pożywek

We wszystkich testach biodegradacji stosuje się pożywki mineralno-organiczne mające na celu zapewnienie optymalnych warunków wzrostu i aktywności bakterii biorących udział w procesie. W prowadzonych badaniach zastosowano pożywki o następującym składzie:

Roztwór 1

NH ₄ Cl	170 g/l	MgSO ₄ · 4H ₂ O	9 g/l
KH ₂ PO ₄	37 g/l	CaCl ₂ · 2H ₂ O	8 g/l

Roztwór 2

FeCl ₃ · 4H ₂ O	2000 mg/l	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ · 4H ₂ O	90 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2000 mg/l	Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	100 mg/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	500 mg/l	NiCl ₂ · 6H ₂ O	50 mg/l
CuCl ₂ · 2H ₂ O	30 mg/l	EDTA	1000 mg/l
ZnCl ₂	50 mg/l	HCl 36%	1 ml/l
H ₃ BO ₃	50 mg/l	Resazurin	500 mg/l

Roztwór 3

Na ₂ S · 9H ₂ O	100 mg/l
---------------------------------------	----------

Ekstrakt drożdżowy — ok. 0,2 g/l**Stężenie substancji toksycznej — metoksychloru**

Badania przeprowadzono przy różnych stężeniach metoksychloru od 5 µg/l do 50 mg/l.

Zakres analiz chemicznych

Podczas badań wykonywano następujące oznaczenia:

- pH — określano za pomocą pehametru z dokładnością do 0,01.
- Chemiczne Zapotrzebowanie Tlenu — oznaczano wg PN-74/C-04578.03.

Oznaczenie wykonano w próbach sączonech.

- Ogólną zawartość kwasów tłuszczowych — oznaczano wg PN-75/C-04616.04.

- Stężenie biomasy — oznaczano metodą wagową wg PN-72/C04559.02.

4. Przebieg badań i interpretacja wyników**4.1. Przebieg doświadczeń**

W badaniach aktywności metanogennej osadu i hamującego wpływu metoksychloru wykonano sześć serii doświadczeń. Stężenie metoksychloru w kolejnych seriach wynosiło: -0,5 µg/l; -0,5 mg/l; -5 mg/l; -10 mg/l; -25 mg/l; -50 mg/l.

Test aktywności metanogennej

Specyficzną aktywność metanogeną osadu określono na podstawie ilości gazu (metanu) wydzielającego się podczas fermentacji zachodzącej w próbkach zawierających badany osad, substraty (kwasy tłuszczowe) i pożywki. Próbki te nie zawierały substancji toksycznych i stanowiły próbki kontrolne.

Test toksyczności

Przeprowadzenie testu toksyczności miało na celu określenie inhibitującego wpływu substancji toksycznej na wzrost mikroorganizmów biorących udział w przemianach metanogennych.

Test przeprowadzono w 2 etapach:

I — dodanie kwasów tłuszczowych, roztworów 1,2,3 oraz substancji toksycznej;

II — dodanie kwasów tłuszczowych, roztworów 1,2,3 bez dodatku substancji toksycznej. Etap II stanowi okres „pozostałej” aktywności osadu po usunięciu bezpośredniego zagrożenia substancją toksyczną.

Podczas inkubacji prób w termostacie rejestrowano ilość wydzielającego się gazu poprzez pomiar ilości roztworu NaOH odprowadzonego do cylindra pomiarowego. Równocześnie wykonano analizy chromatograficzne gazu, w których określono jego skład jakościowy. Próbki gazu do analizy chromatograficznej pobierane były z rurek odprowadzających gaz z butelki 1. do butelki 2.

4.2. Sposób interpretacji wyników

Na podstawie ilości wyprodukowanego gazu w czasie trwania testów porcyjnych sporządzono wykres jego ilości w przeliczeniu na jednostkę czasu. Określono w ten sposób maksymalną produkcję gazu (ml CH₄) oraz wyznaczono maksymalne nachylenie prostej (proste AB rys. 2,3) jako wielkość R wyrażoną w ml CH₄/h (oznaczoną na rys. 2,3).

4.3. Obliczenie aktywności metanogennej osadu

Korzystając ze wzoru do obliczenia wielkości aktywności metanogennej osadu:

$$AKT = (R \cdot 24)/W \cdot V \cdot smo \quad [1]$$

gdzie:

- R — wielkość wyznaczona z wykresu sumowego produkcji gazu (ml CH₄/h),
- W — współczynnik przeliczeniowy (ml CH₄/g ChZT) (dla 34°C przyjęto 414 ml CH₄/g ChZT) [1],
- V — objętość czynna próbki [l],
- smo — stężenie osadu w próbce (g smo/l),

oblicza się kolejno AKT_K i AKT_T ($g\ ChZT_{CH_4}/g\ smo \cdot d$), gdzie:

- AKT_K — aktywność metanogenna osadu w próbce kontrolnej,
 AKT_T — aktywność metanogenna osadu w próbce, do której dodano substancję toksyczną.

4.4. Obliczanie procentowej aktywności osadu z substancją toksyczną (% AKT)

Procent aktywności osadu z substancją toksyczną:

$$\% AKT = (AKT_T / AKT_K) \cdot 100 \quad [2]$$

W przypadku ujednoczenia parametrów analizowanych próbek, wynikających z założeń prowadzenia testów, takich jak: temperatura, objętość próbek oraz stężenie biomasy w próbkach, obliczenie % AKT można wyrazić wzorem:

$$\% AKT = \frac{(R_T \cdot 24) / (W \cdot V \cdot sm\theta)}{(R_K \cdot 24) / (W \cdot V \cdot sm\theta)} \cdot 100 \quad [3]$$

gdzie:

- R_T — wielkość wyznaczona dla próbki z substancją toksyczną,
 R_K — wielkość wyznaczona dla próbki kontrolnej.

4.5. Obliczenia inhibującego wpływu substancji toksycznej wyrażonego w procentach

Wpływ substancji toksycznej wyrażony w % stanowi dopełnienie % AKT do 100%:

$$\% INHIB = 100 - \% AKT$$

Wykresy sporządzone na podstawie wyników produkcji gazu z II etapu testu w przypadku próbek zawierających substancję toksyczną określają „pozostała” aktywność jaką osad jeszcze wykazuje po usunięciu substancji toksycznej. Wielkość jej można określić przez porównanie z aktywnością próbek kontrolnych po ich drugim pożywkowaniu.

4.6. Przykład obliczenia wyników

Przykład obliczeniowy seria 1.

a) obliczenie R_K i R_T z danych z wykresu (rys. 2), dla czasu trwania procesu 96 godz.

$$R_K = \frac{273}{96} \cdot [\text{mlCH}_4/\text{h}] = 2,8 [\text{mlCH}_4/\text{h}]$$

$$R_T = \frac{257}{96} \cdot [\text{mlCH}_4/\text{h}] = 2,7 [\text{mlCH}_4/\text{h}]$$

b) obliczenie AKT_K i AKT_T (wzór 1):

$$\text{AKT}_K = \frac{2,8 \cdot 24}{414 \cdot 0,5 \cdot 0,54} = 0,65 \text{ gChZT}_{\text{CH}_4}/\text{gsmod}$$

$$\text{AKT}_T = \frac{2,7 \cdot 24}{414 \cdot 0,5 \cdot 0,54} = 0,63 \text{ gChZT}_{\text{CH}_4}/\text{gsmod}$$

c) obliczenie % AKT [2]:

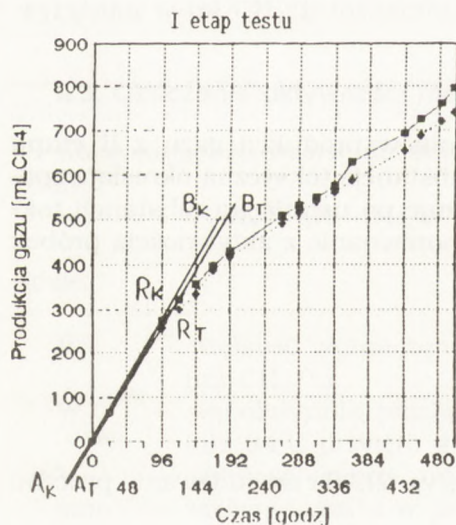
$$\% \text{ AKT} = \frac{\text{AKT}_T}{\text{AKT}_K} \cdot 100 = \frac{0,63}{0,65} \cdot 100 = 97\%$$

d) oliczenie % INHIB:

$$\% \text{ INHIB} = 100 - 97 = 3\% \quad \text{przyjęto } 0\%$$

W tab. 2 zestawiono obliczone dla każdej serii wartości: produkcji gazu dla próbek kontrolnych (R_K) i dla próbek z substancją toksyczną (R_T) oraz metanogenną aktywność (AKT_K i AKT_T), procent aktywności osadu (% AKT) i procent inhibicji substancji toksycznej (% INHIB).

W tab. 3 przedstawiono wartości stężeń metoksychloru i biomasy w poszczególnych seriach badawczych oraz odpowiadającą im procentową wielkość inhibicji wywołaną działaniem badanego pestycydu.



Rys. 2. Krzywa sumowa wyprodukowanego gazu (ml CH₄) — seria I.

■ — próbka I, próbka kontrolna
+ — próbka II, próbka z substancją toksyczną

TABELA 2

OBLICZONE WARTOŚCI R_K , R_T , AKT_K , AKT_T , % AKT I % INHIBICJI DLA PIĘCIU SERII BADAWCZYCH

Seria	R_K	R_T	AKT_K	AKT_T	%AKT	%INHIBICJI
1	2,8	2,7	0,65	0,63	100%	brak
2	7,8	7,9	0,38	0,38	100%	brak
3	6,75	5,9	0,43	0,38	88%	~12%
4	10	9,8	0,60	0,58	~100%	brak
5	9,5	5,3	1,33	0,74	56%	~44%

TABELA 3

OCENA HAMUJĄCEGO WPŁYWU METOKSYCHLORU WYWOŁANA RÓŻNYMI DAWKAMI METOKSYCHLORU PRZY RÓŻNYCH STĘŻENIACH BIOMASY

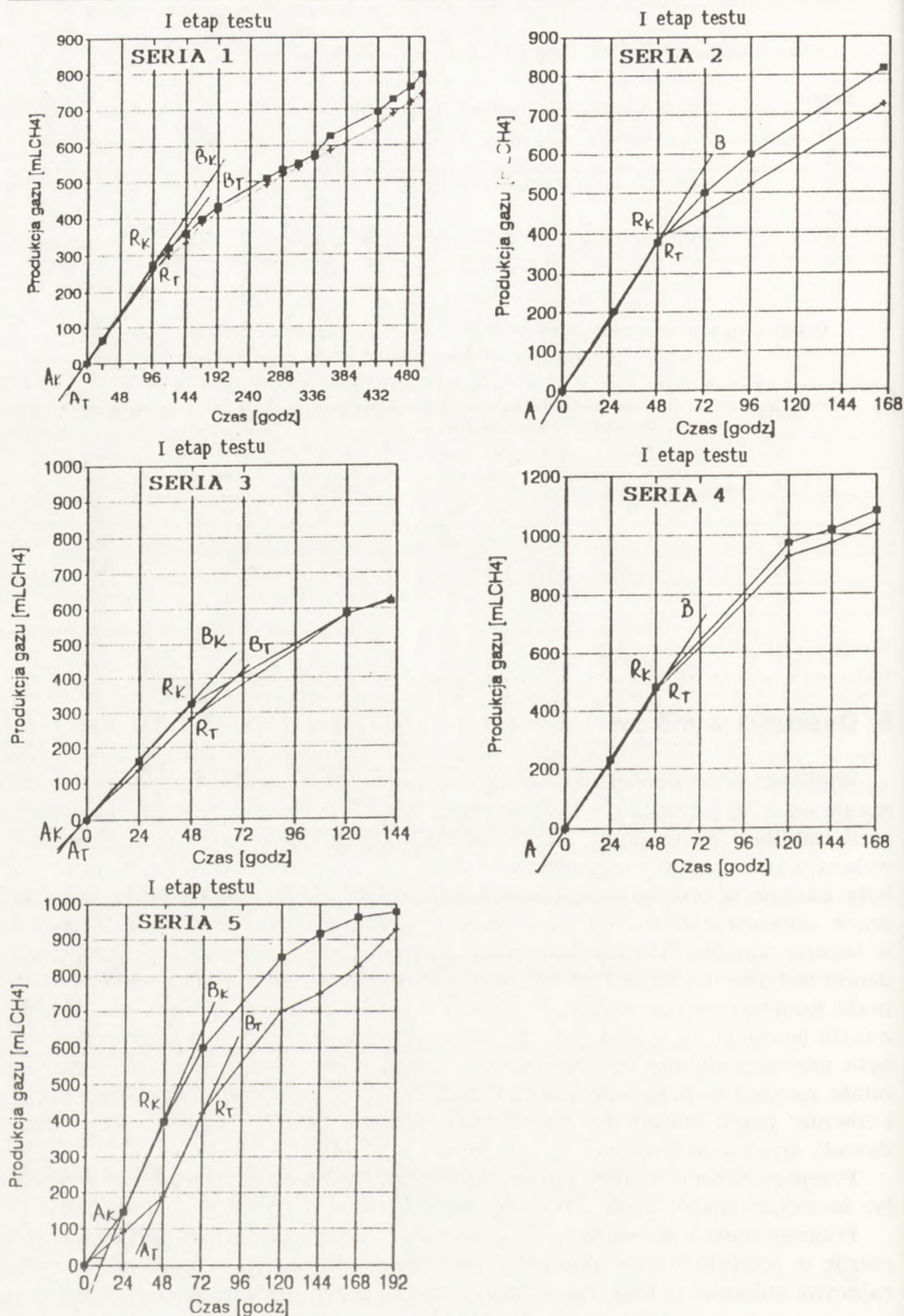
Seria	Dawka metoksychloru (mg/l)	SMO (g/l)	% INHIBICJI
1	0,5 μ g/l	0,54	brak
2	0,5	2,4	brak
3	5	1,8	~12%
4	10	2,0	brak
5	25	0,84	~44%
6	50	1,04	100%

5. Dyskusja wyników

Wielkość specyficznej aktywności metanogennej osadu wahała się w zakresie od 0,38 (seria 2) do 1,33 (seria 5) $\text{gChZT}_{\text{CH}_4}/\text{gsmod}$ (tab. 2). Numerację serii ustalono ze względu na wzrastającą dawkę metoksychloru. Kolejność wykonywania badań nie pokrywała się z ich numeracją. Próbkę serii 2. i 3. były badane w tym samym czasie. Aktywności osadu w tych seriach wynoszące odpowiednio 0,38 i 0,43 $\text{gChZT}_{\text{CH}_4}/\text{gsmod}$ nie różniły się od siebie w istotny sposób. Przed wykonaniem pierwszej serii doświadczeń przeprowadzono wstępne badania testowe osadu. Przed doświadczeniami serii 2. zaistniała konieczność uzupełnienia reaktora UASB osadem. Spadek aktywności z 0,65 (seria 1) do 0,38 i 0,43 $\text{gChZT}_{\text{CH}_4}/\text{gsmod}$ (seria 2. i 3.) spowodowana była prawdopodobnie wprowadzeniem nowej porcji osadu. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku serii 4. i 5. Serię 5. wykonano wcześniej niż 4. i również przed badaniami serii 5. uzupełniano osad w reaktorze co spowodowało spadek aktywności z 1,33 [5] do 0,60 [4] $\text{gChZT}_{\text{CH}_4}/\text{gsmod}$.

Przeprowadzone analizy chromatograficzne gazu fermentacyjnego wykazały, że metan stanowił ok. 70% objętości wytwarzanego w próbkach gazu.

Podczas badań prowadzonych w serii 1. i 2. nie zaobserwowano znacznych różnic w produkcji gazu pomiędzy próbkami kontrolnymi i próbkami zawierającymi substancję toksyczną. Można zatem przypuszczać, że stosowane stę-



Rys. 3. Krzywe sumowe wyprodukowanego gazu (ml CH₄). ■ — próbka I, próbka kontrolna
 + — próbka II, próbka z substancją toksyczną

żenia metoksychloru wynoszące w tych seriach odpowiednio: 5 $\mu\text{g/l}$ i 0,5 mg/l były zbyt małe, aby mogły spowodować hamowanie procesów beztlenowych.

Zarejestrowane różnice w produkcji gazu w seriach 3. i 5. (stężenie metoksychloru: 5 mg/l (3), 25 mg/l (5)) wykazały odpowiednio: 12% i 44% hamowania procesów. 12% obniżenie produkcji gazu przy dawce 5 mg/l wskazuje na zapoczątkowanie hamującego wpływu substancji toksycznej na aktywność osadu, potwierdzone dalszym znacznym spadkiem produkcji gazu przy dawce 25 mg/l .

Przy dawce metoksychloru 10 mg/l w serii 4. nie zaobserwowano spodziewanego spadku produkcji gazu, co spowodowane zostało prawdopodobnie zmianą jakości osadu użytego do badań w tej serii.

Przeprowadzone badania testowe w serii 6. z dawką 50 mg/l wykazały natychmiastowe i całkowite zahamowanie procesów beztlenowych.

Ilości wyprodukowanego gazu, podczas trwania testów w poszczególnych seriach, obrazują krzywe sumowe produkcji gazu, podczas I etapu testu, przedstawione na rys. 3.

W pracy nie zamieszczono wykresów krzywych sumowych wytworzonego gazu z badań po II drugim etapie ponieważ w żadnej serii nie zaobserwowano tzw. pozostałego wpływu hamującego badanej substancji toksycznej.

6. Podsumowanie i wnioski

- Specyficzna metanogenna aktywność osadu z procesu beztlenowego wahała się od 0,38 (seria 2) do 1,33 (seria 5) $\text{gChZT}_{\text{CH}_4}/\text{gsmod}$.
- Badania aktywności osadu oraz inhibitującego wpływu metoksychloru na procesy beztlenowe wykazały, że najmniejsze stężenie tego pestycydu powodujące zauważalną zmianę aktywności osadu wynosiło 5 mg/l .
- Dawka metoksychloru wynosząca 50 mg/l powodowała całkowite i natychmiastowe hamowanie procesów beztlenowych.
- W celu wyeliminowania problemów technicznych związanych z zakłóceniami podczas rejestracji ilości wypieranej przez gaz cieczy należy stosować większą objętość butelek z NaOH tzn. 1 l.
- Na podstawie przeprowadzonych badań nasuwa się konieczność modyfikacji metodyki testów polegająca między innymi na:
 - a) zwiększeniu liczby badanych próbek, co umożliwiłoby dokładniejsze opracowywanie otrzymywanych wyników, np. metodami statystycznymi;
 - b) przeprowadzenie testów przy innych proporcjach dawkowanych lotnych kwasów tłuszczowych;
 - c) przeprowadzenie analiz mikrobiologicznych badanego osadu.
- Przedstawiona metodyka badawcza zostanie wykorzystana w dalszych badaniach nad biodegradacją pestycydów w warunkach beztlenowych.

Literatura

1. Dolfig J., Bloemen W. G. B. M., (1985), *J. Microbiol. Methods*, 4, 1 – 12.
2. James A., Chemicharo C. A. L., Campos C. M. M., (1990), *Wat. Res.* 24, 813 – 825.
3. Kurbiel i in., (1993), *Zastosowanie beztlenowych reaktorów o przepływie pionowym do wstępnego, biologicznego oczyszczania ścieków o niskim stężeniu*, Politechnika Krakowska., Interim Raport No 2, Ameryk. Agencja Ochrony Środ., Biuro Badań i Rozwoju, Cincinnati, Ohio.
4. *Anaerobic Lab Work*, (1991), Handbooks of International Course on Anaerobic Waste Water Treatment, IHE Delft, Wageningen Agricultural University, Holland, 10 – 20.
5. *Laboratory Course Process Parameters and Microbiology*, (1991), Handbooks of International Course on AWWT, IHE, Delft, Wageningen Agriculture University, Holland, 1 – 16.

Determination of sludge methanogenic activity and metoxychlor toxicity under anaerobic conditions

Summary

In the investigations carried out on anaerobic biodegradation of pesticides, specific sludge activity and toxicity of pesticides in batch tests were determined. The specific methanogenic sludge activity was determined i.e. the amount of acetate as an amount of COD for methane production (COD_{CH_4}) per 1 gram of sludge VSS (volatile suspended solid) per 1 day. Using the toxicity test the magnitude of inhibition caused by presence of Methoxychlor — organochlorine insecticide group of pesticides — was assessed.

The laboratory model of UASB was used for sludge cultivation (for methanogenic activity tests). Total volume of the reactor was 6.4 l. A portion of digested sludge taken from a Myślenice municipal wastewater treatment plant was used as an inoculum.

The investigations indicated that the sludge methanogenic activity ranged from 0.38 to 1.33 $\text{gCOD}_{\text{CH}_4}/\text{g VSS d}$ and the smallest concentration of this pesticide which caused a noticeable change in sludge activity was 5 mg/l.

Key words:

anaerobic treatment, batch tests, inhibition, metoxychlor, sludge methanogenic activity, toxicity.

Adres dla korespondencji:

Małgorzata Cimochowicz-Rybicka, Instytut Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska, Politechnika Krakowska, ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków.