

Radosław ŚLĘZAK¹, Ewa LIWARSKA-BIZUKOJC², Monika SOLECKA²

e-mail: ewa.liwarska-bizukojc@p.lodz.pl

¹ Katedra Inżynierii Bioprocusowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź² Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, Łódź

Monitorowanie PHA w oczyszczalniach ścieków województwa łódzkiego

Wstęp

Polihydroksyalkaniany (PHA), nazywane też polihydroksykwasami tłuszczowymi należą do grupy poliestrów alifatycznych zbudowanych z reszt kwasów hydroksykarboksylowych. Związki te są wytwarzane przez bakterie (ok. 300 gatunków) w procesach fermentacji cukrów lub lipidów i magazynowane w komórkach w postaci granul (ziaren, kapsułów). Dojrzała granula ma szerokość ok. 300÷500 nm [Paul i Liu, 2012]. Jest otoczona pojedynczą błoną o grubości 4 nm, w skład której wchodzi fosfolipidy, białka strukturalne i regulatorowe oraz enzymy związane z syntezą i rozkładem PHA. Wnętrze granuli wypełnia odpowiedni polihydroksykwas tłuszczowy. W osadzie czynnym pracującym w warunkach beztlenowych i tlenowych z metabolizmem PHA związane są przede wszystkim bakterie akumulujące fosfor (PAO) oraz akumulujące glikogen (GAO).

PHA (głównie kwas poli-3-hydroksywalerianowy) po raz pierwszy zidentyfikowali Wallen i Rohwedder w 1974 roku [Paul i Liu, 2012]. Autorzy wyodrębnili ten polimer w osadzie czynnym po zastosowaniu ekstrakcji chloroformem. Dopiero około dekadę później poznano kolejne biopolimery poddając analizie HPLC osady z dna morskiego. Wśród 11 różnych PHA dominowały ilościowo kwasy poli-3-hydroksymasłowy i poli-3-hydroksywalerianowy [Paul i Liu, 2012]. Poza HPLC także spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) jest wykorzystywana do określania rodzaju monomerów tworzących poszczególne PHA [Paul i Liu, 2012, Rodgers i Wu, 2010]. Granule polihydroksykwasów tłuszczowych w komórkach drobnoustrojów (bez identyfikacji PHA) można obserwować w mikroskopie optycznym stosując kontrast fazowy (są to składniki komórki o wysokim stopniu refrakcyjności) [Paul i Liu, 2012] lub barwiąc je odpowiednimi barwnikami [Paul i Liu, 2012]. Zastosowanie znalazły tutaj przede wszystkim trzy barwniki: czerń sudanowa B oraz błękit Nilu A i czerwien Nilu [Mesquita i in., 2013].

Do określenia ilości granul PHA w osadzie czynnym można zastosować techniki barwienia preparatów mikroskopowych w powiązaniu z cyfrową analizą obrazu mikroskopowego [Pandolfi i in., 2007; Mesquita i in., 2013]. Pandolfi i in. [2007] użyli tej metody do monitorowania bakterii nitkowatych w osadzie czynnym. Do barwienia granul polihydroksykwasów tłuszczowych w bakteriach nitkowatych autorzy wykorzystali czerń sudanową B. Zaproponowana przez nich procedura składała się z następujących etapów [Pandolfi i in., 2007]:

- 1) wykonanie rozmazu z próbki osadu czynnego,
- 2) barwienie PHA,
- 3) zebranie około 40 obrazów z preparatu mikroskopowego,
- 4) odpowiednia obróbka obrazów za pomocą programu do cyfrowej analizy obrazów,
- 5) określenie udziału PHA w bakteriach nitkowatych.

Mesquita i in. [2013] zastosowali podobną metodę do określenia zawartości polihydroksykwasów tłuszczowych w osadzie czynnym pracującym w warunkach beztlenowych i tlenowych. Granule PHA barwiono w tym przypadku błękitem Nilu A, a postępowanie podzielono na następujące etapy [Mesquita i in., 2013]:

- 1) barwienie PHA w próbce osadu czynnego przed rozmazem,
- 2) wykonanie rozmazu,
- 3) zebranie około 150 obrazów z preparatu mikroskopowego,
- 4) obróbka i analiza obrazów,
- 5) określenie stężenia PHA w osadzie czynnym.

W tab. 1 porównano metodę opracowaną przez Pandolfi i in. [2007] z metodą autorstwa Mesquita i in. [2013].

Celem pracy było poznanie zmian stężenia polihydroksyalkanianów (PHA) w komorach osadu czynnego w dwóch oczyszczalniach

Tab. 1. Porównanie dotychczas stosowanych procedur oszacowania udziału PHA w osadzie czynnym z wykorzystaniem cyfrowej analizy obrazu

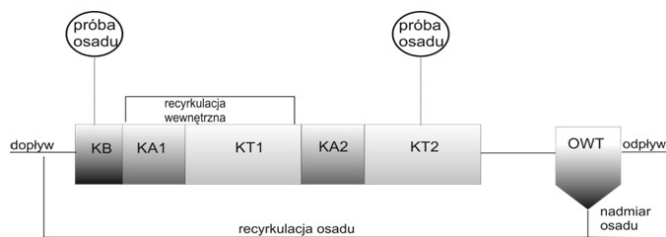
Cecha	<i>Pandolfi i in. [2007]</i>	<i>Mesquita i in. [2013]</i>
Typ preparatu	bakterie barwione po wykonaniu rozmazu	bakterie barwione przed wykonaniem rozmazu
Warunki obserwacji mikroskopowych	powiększenie całkowite 250 razy, jasne pole	powiększenie całkowite 400 razy, ciemne pole
Program komputerowy użyty do zbierania obrazów	<i>Visilog 5</i>	<i>CellB</i>
Główne etapy obróbki i analizy obrazu	(1) zmiana obrazu z RGB na HIS (2) zwiększenie kontrastu obrazu w wyniku wyrównania histogramu (3) wygenerowanie binarnego obrazu w celu wyróżnienia tła i obiektów takich jak kłaczki, bakterie nitkowate oraz inne elementy obrazu (debris) (4) usunięcie z obrazu kłaczek oraz innych elementów obrazu (debris) (5) utworzenie zarysu bakterii nitkowatych (6) usunięcie z zarysu bakterii nitkowatych punktów rozgałęzienia, końców gałęzi oraz przecięcia pomiędzy dwoma nitkami (7) policzenie powierzchni czerwonych i niebieskich pikseli w obrębie zarysu bakterii nitkowatych (piksele niebieskie oznaczają PHA)	(1) wyodrębnienie warstwy czerwonej (R) z obrazu (RGB) (2) korekcja tła za pomocą filtra tophat i wiener (3) identyfikacja regionów PHA słabo i mocno zdefiniowanych (4) dla regionów PHA zdefiniowanych mocno zastosowanie ponownie filtra tophat a następnie określenie krawędzi i wypełnienia, a dla regionów zdefiniowanych słabo zastosowanie segmentacji przez progowanie (5) połączenie obszarów słabo i mocno zdefiniowanych oraz usunięcie szumów (debris) (6) policzenie powierzchni PHA
Mierzone wskaźniki wyrażające ilość PHA w osadzie	Procentowy udział PHA w bakteriach nitkowatych	Stężenie PHA w mg l ⁻¹ poprzez porównanie powierzchni granul ze stężeniem PHA oznaczonym chromatograficznie
Program komputerowy zastosowany do obróbki i analizy obrazu	<i>Visilog 5</i>	<i>Matlab</i>

ścieków województwa łódzkiego, to jest w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu oraz *Grupowej Oczyszczalni Ścieków* w Łodzi. Zmiany PHA śledzono w zależności od warunków oksydoredukcyjnych. Dodatkowo przeprowadzono porównanie wyników dwóch metod służących do pomiaru ilości PHA. Były to: metoda chromatograficzna oraz metoda oparta na cyfrowej analizie obrazu.

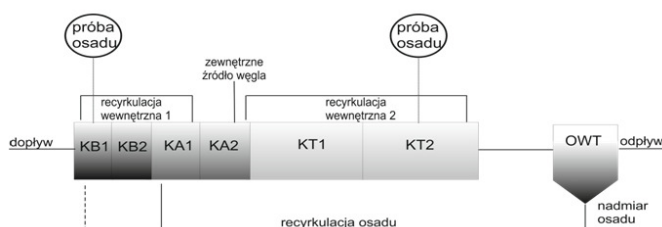
Materiały i metody

Badane oczyszczalnie ścieków

Badania prowadzono w dwóch oczyszczalniach ścieków komunalnych, to jest w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu oraz *Grupowej Oczyszczalni Ścieków* (GOŚ) w Łodzi o wielkości projektowej odpowiednio 100 tys. RLM i 1 026 260 RLM. W okresie prowadzonych badań średnie dobowe natężenie przepływu ścieków w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu wynosiło 8 725 m³d⁻¹, a w *Grupowej Oczyszczalni Ścieków* w Łodzi – 175 450 m³d⁻¹. Część biologiczna *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu składała się z pięciostrefowej komory osadu czynnego (KOC) podzielonej na część: anaerobową (KB), anoksyczną (KA1), aerobową (KT1), anoksyczną drugą (KA2) i aerobową drugą (KT2) oraz osadnika wtórnego (OWT). Zastosowana techno-



Rys. 1. Układ technologiczny części biologicznej oczyszczalni ścieków w Zgierzu



Rys. 2. Układ technologiczny części biologicznej Grupowej Oczyszczalni Ścieków w Łodzi

logia biologicznego oczyszczania ścieków odpowiada pięciostopniowemu układowi *Bardenpho* (Rys. 1). Całkowita objętość komór osadu czynnego wynosi 24 000 m³. Recykulacja zewnętrzna osadu prowadzona jest z osadników wtórnych do części beztlenowej (około 100% ścieków dopływających), a recykulacja wewnętrzna to recykulacja znitryfikowanych ścieków do części niedotlenionej (anoksydacyjnej).

W GOŚ oczyszczanie ścieków prowadzone jest w komorach osadu o objętości całkowitej 19 900 m³ każda. Pracować może równoległe siedem takich komór zintegrowanych z osadnikami wtórnymi. System biologicznego oczyszczania ścieków odpowiada technologii MUCT i składa się z trzech części: anaerobowej (KB), anoksydacyjnej (KA) i aerobowej (KT), osadnika wtórnego (OWT) oraz z trzech strumieni recykulacji (Rys. 2). Recykulacja zewnętrzna osadu prowadzona jest z osadnika wtórnego do części niedotlenionej lub beztlenowej, a recykulacja wewnętrzna mieszaniny ścieków i osadu czynnego przebiega z części napowietrzanej do niedotlenionej (pierwszy strumień recykulacji wewnętrznej) oraz z części niedotlenionej do beztlenowej (drugi strumień recykulacji).

Kampanie pomiarowe

Były to kampanie długo- i krótkoterminowe. Niezależnie od czasu trwania kampanii próbki osadu pobierano w okresie pogody suchej ze skrajnych części komór osadu czynnego, to jest z części beztlenowej i tlenowej. Kampanie długoterminowe były prowadzone przez trzy-nastę miesiąc od września 2013 roku do sierpnia 2014 roku w obu oczyszczalniach ścieków, to jest w Zgierzu i w Łodzi, a próbki pobierano raz w miesiącu. Kampanie krótkoterminowe były przeprowadzone w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu w okresie zimy (styczeń 2014) i lata (czerwiec-lipiec 2014). Kampanie trwały po dwa tygodnie, a w tym czasie próbki osadu pobierano siedmiokrotnie.

Oznaczanie PHA

Oznaczenie PHA z pomocą chromatografii cieczowej wykonano zgodnie ze z metodyką opracowaną przez *Karr i in.* [1983]. Składało się ono z następujących etapów: (1) odwodnienie osadu z użyciem etanolu; (2) hydroliza kwaśna (stężony kwas siarkowy), (3) oznaczenie chromatograficzne na aparacie UPLC (kolumna C18, T = 40°C, eluent 0,1% kwas mrówkowy, przepływ 0,2 ml·min⁻¹, detekcja PDA7 = 210 nm). Wzorcem był kwas krotonowy będący produktem hydrolizy PHA i dehydroksylacji jego monomeru. Stężenie PHA było podawane w mg kwasu krotonowego na litr. Dokładność oznaczenia wynosiła 0,01 mg·l⁻¹.

Oznaczenie PHA metodą analizy obrazu komputerowego obejmowało: (1) przygotowanie rozmazów i ich zabarwienie Sudanem czarnym i safraniną, (2) obserwacje mikroskopowe i zbieranie obrazów, (3) cyfrowa obróbka obrazów z pomocą półautomatycznej procedury

(makroprogram). Oznaczenie objęte jest zgłoszeniem patentowym [*Liwerska-Bizukojć i in.*, 2014].

Wyniki i dyskusja

W tab. 2 porównano ilość PHA w osadzie czynnym zmierzoną z pomocą obydwu metod analitycznych w części beztlenowej (KB) i tlenowej (KT) *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu i Łodzi. W każdej z badanych oczyszczalni ścieków obydwie metody jednoznacznie pokazały, że ilość PHA w osadzie czynnym jest większa w części beztlenowej niż tlenowej. Jest to zgodne z wiedzą na temat mechanizmów biologicznego usuwania fosforu przez mikroorganizmy mające zdolność do akumulacji polifosforanów (PAO) i wykorzystujące w tym celu PHA [*Henze i in.*, 2002]. Stosunek ilości PHA w osadzie czynnym w komorze beztlenowej do jego ilości w komorze tlenowej był wyższy w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu niż w GOŚ w Łodzi. Tu również istnieje zgodność między obiema metodami zastosowanymi do pomiaru PHA. W przypadku metody chromatograficznej ten stosunek wynosił średnio blisko 3,1, a w przypadku cyfrowej analizy obrazu 2,36 w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu. Natomiast w GOŚ było to odpowiednio 2,26 dla chromatografii cieczowej i 1,95 przy zastosowaniu analizy obrazu. Na takie wartości ilorazu KB/KT miała wpływ w głównej mierze większa ilość PHA w osadzie czynnym w warunkach anaerobowych w zgierskiej oczyszczalni (Tab. 2).

Stopień usuwania fosforu w obydwu oczyszczalniach był wysoki i przeważnie wynosił powyżej 85%. Pozwalało to uzyskać oczyszczalniom odpowiednie stężenie fosforu w ściekach wprowadzanych do odbiornika nieprzekraczające 1 mg·l⁻¹. Trudno ocenić wpływ ilości syntezowanego PHA na skuteczność usuwania fosforu, gdyż obydwie oczyszczalnie dodatkowo stosują chemiczne strącanie fosforanów.

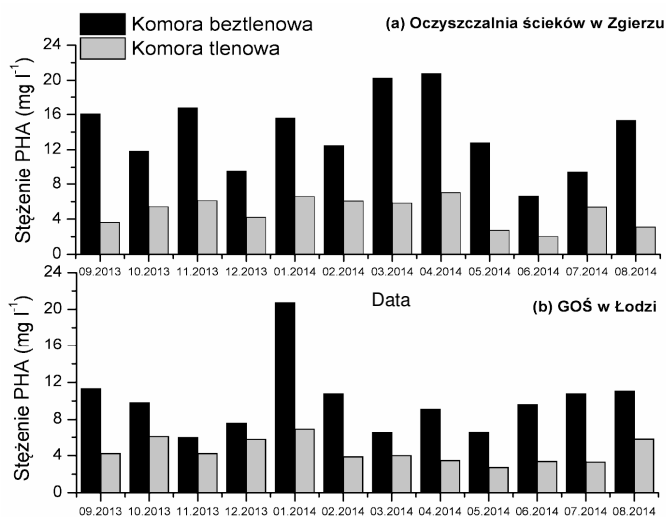
Tab. 2. Średnia ilość PHA (±SD) w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu i GOŚ w Łodzi

Metoda oznaczenia	<i>Oczyszczalni Ścieków</i> w Zgierzu			GOŚ w Łodzi		
	KB	KT	KB/KT	KB	KT	KB/KT
Chromatografia cieczowa (mg·l ⁻¹)	13,97±4,32	4,85±1,64	3,09±1,06	10,00±3,88	4,61±1,44	2,26±0,71
Analiza obrazu (%)	5,03±2,27	2,12±0,83	2,36±0,47	4,7±1,62	2,47±0,91	1,95±0,48

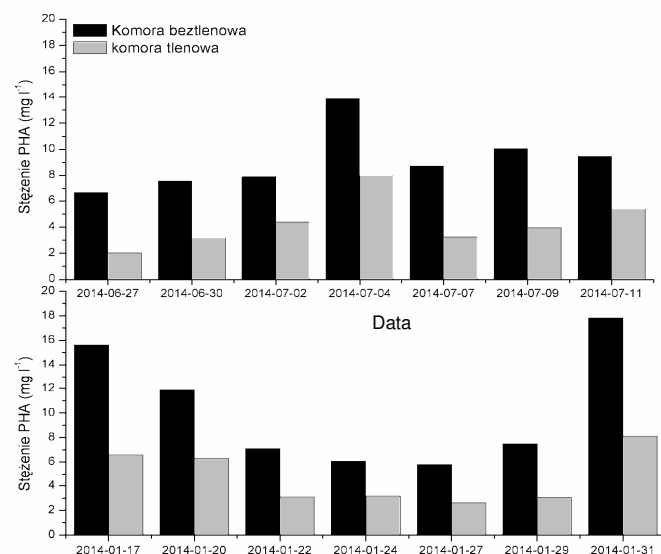
Na rys. 3 przedstawiono zmiany ilości PHA w obydwu badanych oczyszczalniach ścieków w poszczególnych miesiącach. Są to wyniki stężenia PHA oznaczanego chromatograficznie. W *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu stężenie PHA osadzie czynnym w części beztlenowej wynosiło od 6,65 do 20,78 mg·l⁻¹, a w części tlenowej od 3,18 do 7,03 mg·l⁻¹. Natomiast w GOŚ było to odpowiednio od 6,63 do 20,73 mg·l⁻¹ w części beztlenowej i od 2,73 do 6,79 mg·l⁻¹ w części tlenowej. W pracy *Mesquita i in.* [2013] stężenie PHA oznaczane chromatograficznie zmieniało się od 3,79 do 316,95 mg·l⁻¹.

Zmiany PHA uzyskane na podstawie cyfrowej analizy obrazu mają podobny charakter do tych przedstawionych na rys. 3. Każdorazowo więcej PHA stwierdzono w komorze beztlenowej niż tlenowej, choć ten stosunek był na ogół niższy w przypadku cyfrowej analizy obrazu niż oznaczania chromatograficznego. Na przykład w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu wynosił on od 1,77 do 4,95 w przypadku oznaczania z wykorzystaniem chromatografii cieczowej oraz od 1,61 do 3,26 przy zastosowaniu cyfrowej analizy obrazu. Uzyskane wartości KB/KT są zgodne z literaturą, co potwierdza użyteczność obu zastosowanych metod pomiaru PHA w osadzie czynnym. Ilość PHA w osadzie czynnym w komorze beztlenowej jest zwykle od dwóch do czterech razy większa niż w komorze tlenowej [*Rodgers i Wu*, 2010].

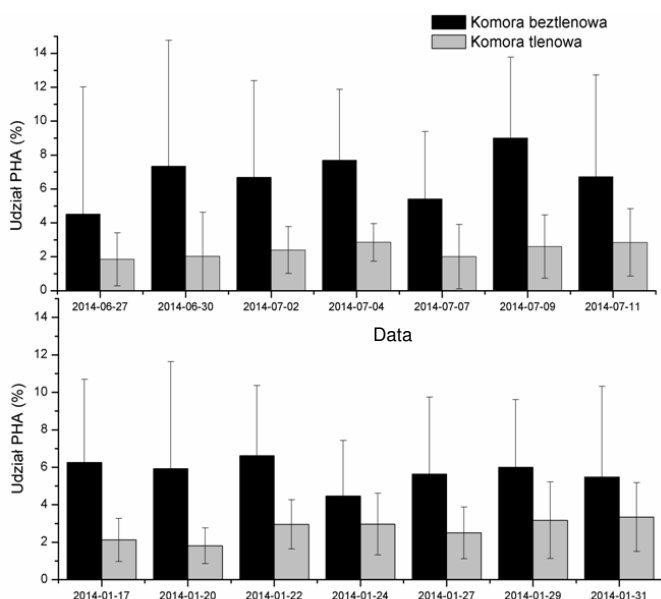
O ile śledzenie zmian w okresie długoterminowym z rzadkim poborem próbek pozwala na uzyskanie informacji o zakresie zmian danej wielkości, w tym przypadku ilości PHA, to częsty pobór próbek w stosunkowo krótkim przedziale czasowym daje możliwość lepszej weryfikacji obydwu metod oznaczania PHA w codziennej eksploatacji oczyszczalni ścieków.



Rys. 3. Zmiany stężenia PHA w osadzie czynnym z oczyszczalni w Zgierzu i Łodzi z wykorzystaniem chromatografii cieczowej.



Rys. 4. Zmiany stężenia PHA w osadzie czynnym z oczyszczalni w Zgierzu w kampaniach krótkoterminowych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej.



Rys. 5. Zmiany stężenia PHA w osadzie czynnym z oczyszczalni w Zgierzu w kampaniach krótkoterminowych z wykorzystaniem cyfrowej analizy obrazu.

W efekcie pozwala ocenić ich przydatność. Na rys. 4 i 5 przedstawiono zmiany PHA podczas kampanii krótkoterminowych prowadzonych w *Oczyszczalni Ścieków* w Zgierzu. Okazało się, że temperatura procesu nie ma istotnego wpływu na biosyntezę PHA w oczyszczalni ścieków. Według wyników uzyskanych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej wyższe stężenia PHA w osadzie czynnym w komorze beztlenowej były w okresie zimowym, gdy temperatura w bioreaktorze wynosiła od 11,1 do 14,3°C niż w lecie przy temperaturach od 20,2 do 23,4°C (Rys. 4). Nie potwierdza tego w pełni cyfrowa analiza obrazu, która pokazuje, że nieco więcej PHA było w lecie niż w zimie, zwłaszcza dotyczy to komory beztlenowej. Jednak w przypadku obydwu zastosowanych metod oznaczania PHA, różnice między wartościami uzyskanymi w kampanii zimowej i letniej są niewielkie i wynoszą średnio 1,08 mg·l⁻¹ w przypadku chromatografii cieczowej i 0,99% w przypadku cyfrowej analizy obrazu. Stąd najprawdopodobniej w zakresie temperatur od 11 do 23°C, temperatura nie ma wpływu na biosyntezę PHA bądź ten wpływ jest niewielki.

Natomiast stosunek ilości PHA w osadzie czynnym w komorze beztlenowej do jego ilości w komorze tlenowej (KB/KT) był wyższy w lecie niż zimą. To ostatnie potwierdzają obydwie metody oznaczania PHA. Przy zastosowaniu chromatografii cieczowej wynosił on 2,32 w lecie, a 2,19 w zimie, a według analizy obrazu było to odpowiednio 2,87 i 2,25.

Wnioski

Obie zastosowane w tej pracy metody oznaczania PHA mogą być wykorzystane do monitorowania zmian PHA w komorach osadu czynnego oczyszczalni ścieków.

Pomimo odmiennej metodyki, wyniki otrzymywane z ich pomocą są porównywalne. Dotyczy to zwłaszcza stosunku ilości PHA w osadzie czynnym w komorze beztlenowej do jego ilości w komorze tlenowej (KB/KT). Jednoznacznie wskazuje on na większe ilości PHA w osadzie czynnym w komorze beztlenowej niż tlenowej w obydwu oczyszczalniach ścieków niezależnie od tego, czy kampania jest długo- czy krótkoterminowa. Stosunek ten zmieniał się od 1,61 do 4,95, choć przeważnie wynosił między 2 a 3.

Nie zaobserwowano zależności liniowej pomiędzy wynikami oznaczeń PHA otrzymanymi obiema metodami.

LITERATURA

- Henze M., Harremoës P., Jansen J., Arvin E., 2002. *Wastewater treatment. Biological and chemical processes*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Karr D.B., Waters J.K., Emerich D.W., 1983. Analysis of poly-β-hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, nr 6, 1339–1344.
- Liwska-Bizukojć E., Bizukojć M., Ślęzak R., Solecka M., 2014. Oszacowanie udziału PHA w osadzie czynnym z pomocą cyfrowej analizy obrazu. Zgłoszenie patentowe nr P. 40 948
- Mesquita D.P., Leal C., Cunha J.R., Oehmen A., Amaral A.L., Reis M.A.M., Ferreira E.C., 2013. Prediction of intracellular storage polymers using quantitative image analysis in enhanced biological phosphorus removal systems *Anal. Chim. Acta.*, 770, 36-44. DOI: 10.1016/j.aca.2013.02.002
- Pandolfi D., Pons M.N., da Motta M., 2007. Characterization of PHB storage in activated sludge extended filamentous bacteria by automated colour image analysis *Biotechnol. Lett.*, 29, 1263-1269. DOI: 10.1007/s10529-007-9387-5
- Paul E., Liu Y., 2012. *Biological Sludge Minimization and Biomaterials/Bioenergy Recovery Technologies*. John Wiley & Sons, Hoboken
- Rodgers M., Wu G., 2010. Production of polyhydroxybutyrate by activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal *Biores. Technol.*, 101, nr 3, 1049-1053. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.08.107

Praca została zrealizowana w ramach projektu rozwojowego NR14-0004-10 finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.