

Przegląd Naukowy – Inżynieria i Kształtowanie Środowiska (2016), 25 (4), 425–432
Prz. Nauk. Inż. Kszt. Środ. (2016), 25 (4)
Scientific Review – Engineering and Environmental Sciences (2016), 25 (4), 425–432
Sci. Rev. Eng. Env. Sci. (2016), 25 (4)
<http://iks.pn.sggw.pl>

Beata KOŃCZAK¹, Korneliusz MIKSCH²

¹Zakład Ochrony Wód, Główny Instytut Górnictwa
Department of Water Protection, Central Mining Institute

²Katedra Biotechnologii Środowiskowej, Politechnika Śląska
Environmental Biotechnology Department, Silesian University of Technology

Wpływ polimerów zewnątrzkomórkowych na granulację osadu czynnego w warunkach tlenowych **Influence of extracellular polymeric substances on aerobic granulation**

Słowa kluczowe: polimery zewnątrzkomórkowe, tlenowa granulacja, tlenowe granule
Key words: extracellular polymeric substances, aerobic granulation, aerobic granules

Wprowadzenie

Biogranulację można zdefiniować jako proces agregacji komórek bakterii zoogloalnych bakterii nitkowatych, grzybów, glonów i pierwotniaków, w wyniku którego uformowana zostaje stabilna, trójwymiarowa struktura, odporna na oddziaływanie sił hydrodynamicznych (Burdman i in., 2000a, b; Weber i in., 2007). Proces biogranulacji wspomaga obecność polimerów zewnątrzkomórkowych EPS (ang. extracellular polymeric substances) syntetyzowanych wewnątrz komórek bakteryjnych i wydzielanych przez nie na zewnątrz.

Do polimerów zewnątrzkomórkowych zaliczmy głównie polisacharydy i białka, a także fragmenty DNA i produkty lizy komórek bakteryjnych (Tian, 2008; Sheng i in., 2010; Lin i in., 2014). Substancje EPS odgrywają ważną rolę w procesie biogranulacji, ponieważ pozwalają na powstawanie trwałych granul o trójwymiarowej zintegrowanej strukturze.

Budowa chemiczna polimerów zewnątrzkomórkowych jest zmienna i zależy od rodzaju mikroorganizmów oraz czynników środowiskowych.

Substancje EPS stanowią ważny element składowy bioagregatów, do których zalicza się kłaczkę osadu czynnego, biofilmy, tlenowe i beztlenowe granule. Uważa się, że ich rola jest szczególnie istotna w transformacji kłaczków osadu czynnego w formę granulowaną, gdyż ich zawartość w granulach jest o wiele

większe niż w konwencjonalnym osadzie czynnym (Tay i in., 2001).

W literaturze można spotkać różne informacje dotyczące kompozycji substancji EPS w biogranulach. Niektóre badania wykazały, że najważniejszym komponentem granul są białka (McSwain i in., 2005; Tu i in., 2010), a stosunek białek do polisacharydów (PN : PS – proteiny : polisacharydy) jest relatywnie stały podczas formowania się granul osadu czynnego. Inni badacze podają (Park i in., 2008), że największą ilość stanowią usieciowane polisacharydy pozwalające na uformowanie się trójwymiarowych sieci które przyczyniają się do powstania zwartych przestrzennych granul.

Według Flemming i Wingender (2001) polisacharydy stanowią matrycę wiążącą inne komponenty polimerów zewnątrzkomórkowych oraz mikroorganizmy. W swojej pracy sugerują, iż dla granul osadu czynnego pełnią one podobną rolę jak ściany w domu. Ze względu na swój udział w stabilizowaniu struktury bioagregatów, nie mogą być one zużywane w procesach życiowych. Ponadto Chen i inni (2007) oraz Adav i inni (2008) w swoich badaniach wykazali, że α - i β -D-glukopiranoza (polisacharydy) akumulowane są na powierzchni granuli, w strefie, gdzie występują najaktywniejsze populacje mikroorganizmów, korzystające z łatwo dostępných substancji organicznych. Polisacharydy spełniają więc rolę lepiszcza i podpory dla kolonii mikroorganizmów. W głębszych warstwach, gdzie utrudniona jest penetracja substratu i tlenu, znajdują się przede wszystkim białka, które stanowią źródło substancji odżywczych dla mikroorganizmów z tej strefy. Najważniejszą rolę w formowaniu granul osadu

czynnego odgrywa frakcja kapsularnych polimerów zewnątrzkomórkowych.

Nadal nie uzyskano jednoznacznych wyników badań potwierdzających wykorzystywanie substancji EPS jako źródła węgla przez mikroorganizmy bakteryjne (Fang i in., 2002; Li i in., 2008; Zhang i in., 2015). Według Sutherland (1999) bakterie nie degradują polisacharydów wchodzących w skład EPS, które same wyprodukowały. Zawartość polisacharydów wbudowanych w polimerową otoczkę mikroorganizmów jest relatywnie stała, zawartość białek zmienia się w zależności od warunków środowiskowych. Inni badacze (Wang i in., 2006) sugerują, że mikroorganizmy regulują ilość substancji EPS, a zwłaszcza białek, aby zachować równowagę między siłami przyciągania i odpychania pomiędzy molekułami. Według Alleoni (2006) stabilność struktury bioaglomeratów zależy od relacji między siłami odpychania i przyciągania. W przypadku, gdy siły przyciągania dominują, powstają zwarte struktury trójwymiarowe, a przy wzroście sił odpychania bioaglomeraty charakteryzują się rozluźną strukturą przestrzenną.

Dynamika zmian ogólnej zawartości związków organicznych, wyrażonej jako ChZT, w czasie pojedynczego cyklu pracy reaktora wsadowego z granulowanym osadem czynnym GSBR (ang. granular sludge sequencing batch reactor) została opisana przez Wang i innych (2006). Wciąż jednak jest niewiele informacji na temat zmian ilościowych i jakościowych polimerów zewnątrzkomórkowych podczas pojedynczego cyklu pracy reaktorów GSBR (Shin i in., 2000). Opis tych zjawisk pozwoliłby na lepsze zrozumienie znaczenia polimerów zewnątrzko-

mórkowych w formowaniu i stabilizacji granul osadu czynnego.

Celem niniejszej pracy jest określenie, który rodzaj polimerów zewnątrzkomórkowych ma największy wpływ na proces formowania tlenowych granul oraz w jaki sposób zmienia się zawartość polimerów zewnątrzkomórkowych. Praca przedstawia oryginalne wyniki badań podjętych w tym celu.

Metodyka badań

Badania prowadzono w reaktorze sekwencyjnym SBR (ang. sequencing batch reactor) o objętości czynnej 2 dm^3 , wysokości 565 mm i średnicy wewnętrznej 83,5 mm w temperaturze pokojowej. Reaktor pracował w cyklu 3-godzinny, na który składały się fazy: doprowadzania ścieków (3 min), napowietrzania (170 min), sedymentacji (3 min), odprowadzania ścieków oczyszczonych (3 min) i przerwy (1 min). Reaktor został zaszczerpiony osadem czynnym pobranym z oczyszczalni ścieków w Gliwicach. Eksperyment prowadzono na ściekach syntetycznych sporządzonych według metodyki zaproponowanej przez Beun i innych (1999) zawierających następujące substancje [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]: 0,75 CH_3COONa , 0,1 NH_4Cl , 0,05 MgCl_2 , 0,02 FeCl_3 , 0,016 CaCl_2 , 0,075 KH_2PO_4 ; mikroelementy: 0,05 H_3BO_3 , 0,05 ZnCl_2 , 0,03 CuCl_2 , 0,05 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,05 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,05 AlCl_3 , 0,05 $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,05 NiCl . Stężenie tlenu rozpuszczonego w reaktorze utrzymywano na poziomie około $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tlen rozpuszczony, azotany, azotyny, azot amonowy, substancje rozpuszczone, zawiesinę organiczną i indeks obje-

tościowy określono za pomocą standardowych metod analitycznych (Clesceri i in., 1998). Zawartość ChZT określano przy użyciu testów kit MERCK COD Spectroquant®.

W trakcie badań określano w ściekach zawartość polisacharydów metodą kolorymetryczną opisaną przez Dubois i innych (1956) oraz białek i DNA oznaczanych metodą fluorometryczną z wykorzystaniem Quant-iT™ Assays i stacji analitycznej Qubit™.

Obserwacje mikroskopowe prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego Moticam BA400 wraz z kamerą mikroskopową Motic 245A. Analizy uzyskanych zdjęć mikroskopowych dokonano z użyciem programu Motic Image Plus 2.0.

Ekstrakcji polimerów zewnątrzkomórkowych dokonywano zmodyfikowaną procedurą opisaną przez Yu i innych (2009). Biomase wirowano przez 15 min z prędkością obrotową 2000 obr./min zbierano supernatant, filtrowano go przez filtr wykonany z octanu celulozy o średnicy porów $45 \mu\text{m}$ i oznaczano jako frakcja CN (ciecz nadosadowa). Pozostały osad zawieszano w buforze PBS (buforowanym fosforanami roztworze soli fizjologicznym o odczynie pH 7,4). Procedurę powtarzano dwukrotnie, pozyskując w ten sposób frakcje oznaczane kolejno jako: frakcja SLIME (śluzowa otoczka) i frakcja polimerów zewnątrzkomórkowych luźno związanych LB-EPS (ang. LB – loosely-bound) z granulami. Osad powtórnie zawieszano w buforze PBS i ekstrahowano z wykorzystaniem żywicy kationo-wymiennej Dowex, zgodnie z procedurą przedstawioną przez Frølund i innych (1996). Dawka Dowex (50×8 , Na^+ form, 20–50 mesh, Sigma Aldrich)

wynosiła 60 g·g_{smo}. Czas ekstrakcji wynosił 1 h, ekstrakcja prowadzona była w temperaturze 4°C, w kąpieli lodowej. Proces ekstrakcji kończono wirowaniem przez 20 min z prędkością 20 000 obr./min i filtrowaniem przez filtr wykonany z octanu celulozy o średnicy porów 45 µm. Materia organiczna w pozyskanej cieczy nadosadowej stanowiła frakcję polimerów zewnątrzkomórkowych mocno związanych TB-EPS (ang. TB – tightly-bound) z granulami osadu czynnego. Ogólna ilość białek i polisacharydów określona została jako suma zawartości białek i polisacharydów w poszczególnych frakcjach EPS: frakcji CN, SLIME, LB-EPS oraz TB-EPS.

Wyniki badań i dyskusja

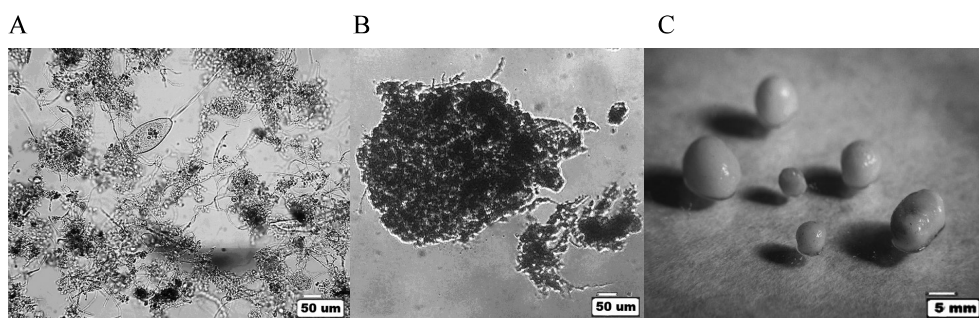
W czasie pierwszych 7 dni zaobserwowano tworzenie się granul o średnicach 0,1–0,2 mm (rys. 1). Po upływie 20 dni w reaktorze można było zaobserwować granule o zwartej strukturze i średnicach 2–5 mm. Po 30 dniach w reaktorze można były dostrzec „gołym okiem” granule o jasnym zabarwieniu.

W granulach o największych średnicach zauważalna była, w części środkowej, materia o czarnym zabarwieniu. Po 60 dniach wymiar granul mieścił się w przedziale 3–29 mm (rys. 1). Szczegółowe dane dotyczące przyrostu średnic granul w trakcie trwania eksperymentu można znaleźć w pracy Miksch i Kończak (2012).

W czasie trwania fazy napowietrzania obserwowano zmniejszanie się ChZT oraz wzrost zawartości białek zewnątrzkomórkowych, a zawartość polisacharydów prawie się nie zmieniała (rys. 2). Może to sugerować, iż polisacharydy są najważniejszym komponentem w stabilizacji granuli.

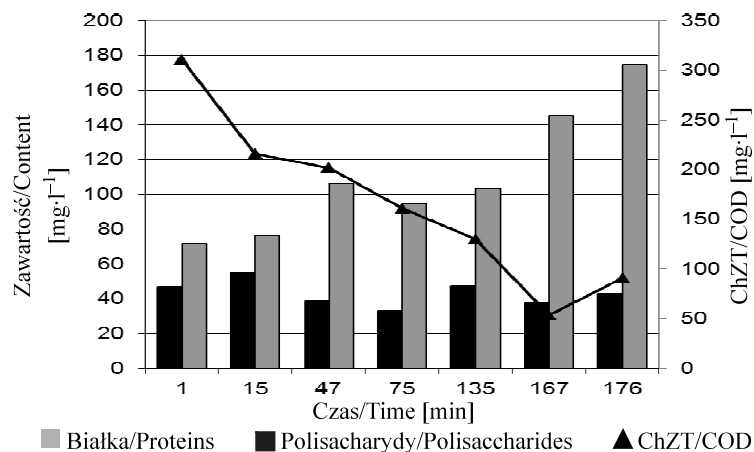
Wyniki badań wskazują, iż wraz z czasem napowietrzania mikroorganizmy wydzielają białka zewnątrzkomórkowe, a następnie magazynują je wewnątrz granuli, co wyraża się, jako wzrost zawartości białek kapsularnych w ekstrahowanej frakcji mocno związanych EPS (TB-EPS) – rysunek 3.

Obserwowano uwalnianie białek do cieczy nadosadowej (CN), co w konsekwencji przyczynia się do wzrostu ilości zanieczyszczeń organicznych w odpływie i tym samym zmniejszenia efektywności



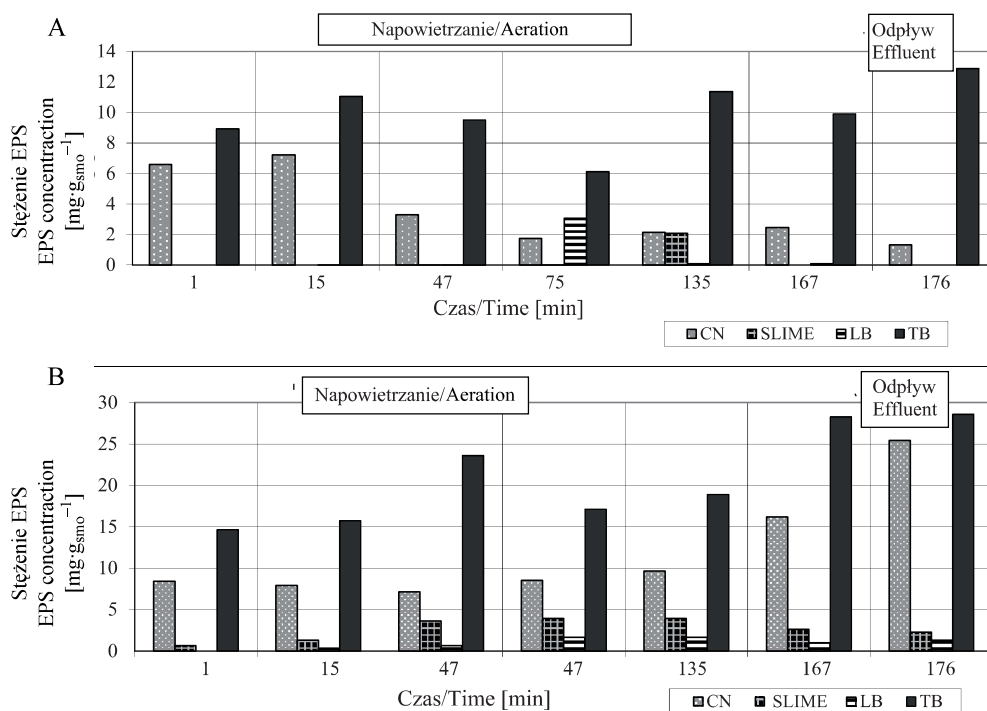
RYSUNEK 1. Zmiana morfologii osadu podczas biogranulacji: osad kłaczkowaty (A), drobne granule (B), dojrzałe granule (C) (Miksch i Kończak, 2012)

FIGURE 1. The change of sludge morphology during biogranulation: flocs (A), small granules (B), mature granules (C) (Miksch and Kończak, 2012)



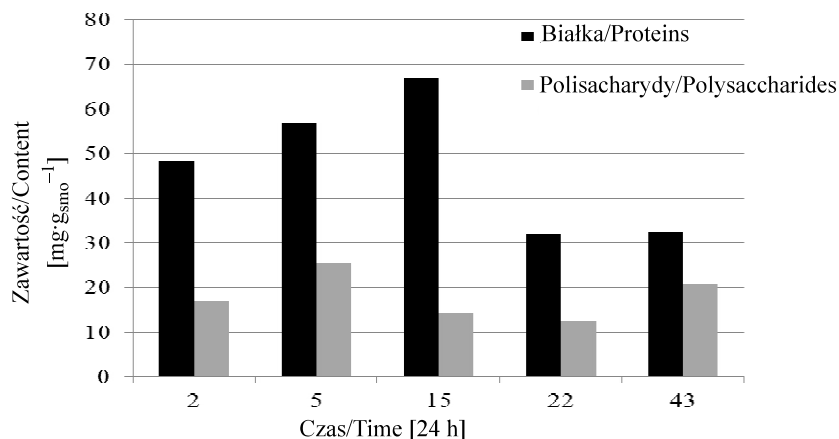
RYSUNEK 2. Zmiany zawartości białek, polisacharydów i ChZT w czasie jednego cyklu w 60. dobie prowadzenia eksperymentu

FIGURE 2. The change of protein, polysaccharides and COD concentration during one of cycle in 60-day experiment



RYSUNEK 3. Zmiana zawartości zewnątrzkomórkowych białek (A) i polisacharydów (B) w różnych frakcjach EPS podczas jednego cyklu pracy reaktora (60. doba). Oznaczenia w tekście

FIGURE 3. The change of extracellular protein (A) and polysaccharides (B) concentration in the different EPS fractions during one of cycle operation (60 days). Explanation in the text



RYSUNEK 4. Zmiany w kompozycji frakcji TB-EPS w czasie formowania tlenowych granul
 FIGURE 4. The change of TB-EPS composition during formation of aerobic granules

procesu oczyszczania ścieków (rys. 3, 4). Z analizy zmian zawartości polisacharydów w poszczególnych frakcjach wynika, że biodegradacji ulegały polisacharydy obecne są w cieczy nadosadowej (CN). Jednocześnie obserwowano nieznaczłą produkcję kapsularnych polisacharydów (TB).

Rysunek 4 przedstawia wyniki zmian zawartości poszczególnych komponentów polimerów zewnątrzkomórkowych frakcji TB-EPS w okresie biogranulacji. Badania wykazały, że zawartość białek, a w mniejszym stopniu polisacharydów, wzrastała aż do momentu uformowania pierwszych granul, tj. do 15 doby. Od 16 doby zawartość EPS zaczęła spadać, a po 23 dniach zawartość EPS utrzymywała się na stałym poziomie. Wyniki te są zbieżne z rezultatami otrzymanymi przez Li i innych (2008). Powstawanie polimerów zewnątrzkomórkowych ma wpływ na powstawanie granul zarówno w reaktorach SBR, jak i w reaktorach membranowych.

Podsumowanie

Wyniki badań wskazują, że formowanie granul osadu czynnego ściśle wiąże się z produkcją polimerów zewnątrzkomórkowych. Mikroorganizmy produkują i akumulują głównie polimery kapsularne (TB-EPS), aż do momentu uformowania się stabilnych i gęstych granul.

W trakcie fazy napowietrzania następuje spadek zawartości białek, gdyż mikroorganizmy zużywają w warunkach niedoboru substratów nagromadzone wcześniej białka zewnątrzkomórkowe. Część białek zewnątrzkomórkowych zostaje uwolniona do cieczy nadosadowej, powodując wtórne zanieczyszczenie ścieków oczyszczonych substancjami organicznymi.

Na etapie granulacji osadu czynnego powinno się kontrolować czas trwania fazy napowietrzania w celu uniknięcia wtórnego wydzielania do cieczy nadosadowej białek zewnątrzkomórkowych.

Wykazano, że polisacharydy stanowią ważny składnik strukturalny granul.

Literatura

- Adav, S.S., Lee, D.J. i Tay, J.H. (2008). Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Research*, 42, 1644-1650.
- Alleoni, C.A.C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz)*, 63 (3), 291-298.
- Beun, J.J., Hendriks, A., Van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A. i Heijnen, J.J. (1999). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 33, 2283-2290.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Diaz, M., Gil-Serrano, A. i Okon, Y. (2000a). Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS Microbiology Letters*, 189, 259-264.
- Burdman, S., Okon, Y. i Jurkevitch, E. (2000b). Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical Reviews in Microbiology*, 26 (2), 91-110.
- Chen, M.Y., Lee, D.J. i Tay, J.H. (2007). Distribution of extracellular polymeric substances in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1463-1469.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. i Eaton, A.D. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. Pobrano z lokalizacji: <http://www.standardmethods.org/>
- Dubois, M.K., Gilles, J.K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. i Smith, F. (1956). Pfizer flocon 4800 procedure-phenol/sulfuric acid method. *Analytical Chemistry*, 28, 350-352.
- Fang, H.H.P., Liu, H. i Zhang, T. (2002). Characterization of hydrogen-producing granular sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 78 (1), 44-52. doi:10.1002/bit.10174.
- Flemming, H.C. i Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substance (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Extracellular Polymeric Substances – the Construction Material of Biofilms*, 43, 1-8.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. i Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 1749-1758. doi:10.1016/0043-1354(95)00323-1.
- Li, X.F., Li, Y.J., Hua, Z.Z., Du, G.C. i Chen, J. (2008). Correlation between extracellular polymeric substances and aerobic biogranulation in membrane bioreactor. *Separation and Purification Technology*, 59, 26-33.
- Lin, H., Zhang, M., Wang, F., Meng, F., Liao, B.-Q., Huachang, H. i Gao, W. (2014). A critical review of extracellular polymeric substances (EPSs) in membrane bioreactors: Characteristics, roles in membrane fouling and control strategies. *Journal of Membrane Science*, 460 (15), 110-125. doi:10.1016/j.memsci.2014.02.034.
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M. i Wilderer, P.A. (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2), 1051-1057. doi:10.1128/AEM.71.2.1051-1057.2005.
- Miksch, K. i Kończak, B. (2012). Distribution of extracellular polymeric substances and their role in aerobic granule formation. *Chemical Engineering and Processing*, 33 (4), 679-688. doi:10.2478/v10176-012-0057-3.
- Park, C.H., Novak, J.T., Helm, R.F., Ahn, Y.O. i Esen, A. (2008). Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Research*, 42, 3879-3889. doi:10.1016/j.watres.2008.05.014.
- Sheng, G.P., Yu, H.Q. i Li, X.Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology Advances*, 28 (6), 882-894. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.001.
- Shin, H.S., Kang, S.K. i Nam, S.J. (2000). Effect of carbohydrates to protein ration in EPS on sludge settling characteristic. *Biotechnology Bioprocess Engineering*, 5, 460-464. doi:10.1007/bf02931948.

- Sutherland, I.W. (1999). Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 39, 319-328.
- Tay, J.H., Liu, Q.S. i Liu, Y. (2001). The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 222-226. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00986.
- Tian, Y. (2008). Behaviour of bacterial extracellular polymeric substances from activated sludge: a review. *International Journal of Environment and Pollution*, 32 (1), 78-79. doi:10.1504/IJEP.2008.0169.
- Tu, X., Su, B.S., Li, X.N. i Zhu, J.R. (2010). Characteristics of extracellular fluorescent substances of aerobic granular sludge in pilot-scale sequencing batch reactor. *Journal of Central South University of Technology*, 17 (3), 522-528. doi:10.1007/s11771-010-0517-1.
- Wang, Z., Liu, L., Yao, J. i Cai, W. (2006). Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Chemosphere*, 63, 1728-1735. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.09.018.
- Weber, S.D., Ludwig, W., Schliefer, K.H. i Fried, J. (2007). Microbial Composition and Structure of Aerobic Granular Sewage Biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 73 (19), 6233-6240. doi:10.1128/AEM.01002-07.
- Yu, G.H., Yuang, Y.C.H., Lee, D.J., He, P.J. i Shao, L. M. (2009). Enhanced aerobic granulation with extracellular polymeric substances (EPS)-free pellets. *Bioresource Technology*, 100, 4611-4615.
- Zhang, P., Shen, Y., Guo, J.S., Li, C.H., Wang, H., Chen, Y.P., ... i Fang, F. (2015). Extracellular protein analysis of activated sludge and their functions in wastewater treatment plant by shotgun proteomics. *Scientific Reports*, 5, 120-141. doi:10.1038/srep12041

Streszczenie

Wpływ polimerów zewnątrzkomórkowych na granulację osadu czynnego w warunkach tlenowych. Badano wpływ polimerów zewnątrzkomórkowych na pro-

ces biogranulacji. Po siedmiu dniach trwania eksperymentu obserwowano pojawianie się tlenowych biogranul osadu czynnego, Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem produkcji substancji EPS następował wzrost średnic granul. Dominującym składnikiem substancji EPS w granulach były białka. W porównaniu do luźno związanych substancji EPS (LB-EPS), mocno związane EPS (TB-EPS) miały znaczący udział w formowaniu się granul. Wykazano, że polisacharydy stanowią ważny składnik strukturalny granul.

Summary

Influence of extracellular polymeric substances on aerobic granulation. In this study the influence of extracellular polymeric substances on biogranulation process was investigated. Aerobic biogranules were emerged from floc sludge on day 7 of operation. The average diameter of biogranules increase due to EPS production. It has been found that the predominant component of EPS are proteins. Compared to loosely bound EPS (LB-EPS), tightly bound EPS (TB-EPS) showed more significant role in granules formation. It has been shown that polysaccharides are an important structural component of granules.

Authors' adress:

Beata Kończak
Główny Instytut Górnictwa,
Zakład Ochrony Wód
40-166 Katowice, Plac Gwarków 1,
Poland
e-mail: bkonczak@gig.eu

Korneliusz Miksch
Politechnika Śląska
Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
44-100 Gliwice, ul. Akademicka 2
Poland
e-mail: korneliusz.miksch@polsl.pl