P 3355/83

ZESZYTY
NAUKOWE
POLITECHNIKI
ŚLĄSKIEJ

wypoż. [illegible]

INŻYNIERIA SANITARNA

Z. 24
GLIWICE
1983

P.3355/83

POLITECHNIKA ŚLĄSKA

ZESZYTY NAUKOWE

Nr 753

KORNELIUSZ MIKSCH

AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA DROBNOUSTROJÓW W PROCESIE OSADU CZYNNEGO

GLIWICE 1983

cz. 8481

OPINIODAWCA

Prof. dr hab. Jerzy Chmielowski

KOLEGIUM REDAKCYJNE

Wiesław Gabzdyl (redaktor naczelny), *Wacław Kusznik* (redaktor działu), *Elżbieta Stinzing* (sekretarz redakcji)

OPRACOWANIE REDAKCYJNE

Anna Błażkiewicz

Wydano za zgodą
Rektora Politechniki Śląskiej

PL ISSN 0072-4696

Dział Wydawnictw Politechniki Śląskiej
ul. Kujawska 3, 44-100 Gliwice

Nakł. 150+85 Ark. wyd. 4,5 Ark. druk. 4,875 Papier drukowy kl. V 70x100, 70 g
Oddano do druku 3.01.1983 Podpis. do druku 15.02.1983 Druk ukończ. w marcu 1983
Zamówienie 16/83 B-23 Cena zł 45,–

Skład, fotokopie, druk i oprawę
wykonano w Zakładzie Graficznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach

P. 152/83

SPIS TREŚCI

Str.

1. WSTĘP 7

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA 9

2.1. Modele matematyczne procesu osadu czynnego 9

2.2. Ocena stanu fizjologicznego mikroorganizmów za pomocą testu TTC 10

2.3. Modyfikacje testu TTC 14

2.4. Zastosowanie testu TTC w bioinżynierii sanitarnej 15

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA 17

3.1. Metodyka badań 17

3.1.1. Materiał badań i warunki hodowli drobnoustrojów 17

3.1.2. Oznaczenia analityczne 18

3.1.2.1. Oznaczenie aktywności dehydrogenaz 18

3.1.2.2. Pozostałe oznaczenia analityczne 19

3.2. Wyniki badań 20

3.2.1. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego (I seria badań) 20

3.2.2. Biodegradacja fenolu (II seria badań) i glukozy przez drobnoustroje osadu czynnego 26

3.2.3. Biodegradacja składników wód odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego oraz bezwodnika ftalowego przez drobnoustroje osadu czynnego 37

3.2.4. Ocena kinetyki procesu osadu czynnego w oparciu o pomiar aktywności dehydrogenaz 47

4. DYSKUSJA WYNIKÓW 56

4.1. Wykorzystanie wykresu fazowego w interpretacji zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów w procesie osadu czynnego 56

4.2. Korelacja pomiędzy aktywnością dehydrogenaz drobnoustrojów a szybkością usunięcia substratu w stanie równowagi dynamicznej procesu osadu czynnego 58

4.3. Analiza kinetyki procesu osadu czynnego z uwzględnieniem aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów 63

4.4. Potwierdzenie tezy pracy w oparciu o wyniki badań innych autorów 66

5. STRESZCZENIE I WNIOSKI 68

6. LITERATURA 71

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SYMBOLI I JEDNOSTEK

a - współczynnik regresji

p - poziom ufności, %

r - współczynnik korelacji

sm - sucha masa osadu czynnego, kg sm

smo - sucha masa organiczna osadu czynnego, kg smo

A_b - aktywność biologiczna (fizjologiczna)

A_d - aktywność dehydrogenaz

A_v - aktywność dehydrogenaz w jednostce objętości reaktora, g TF.m^{-3}.h^{-1}

A_x - aktywność właściwa dehydrogenaz, g TF.gsmo^{-1}.h^{-1}

A_x^m - aktywność właściwa nie rozmnażającej się, ale metabolicznie aktywnej frakcji biomasy

A_x^{II} - aktywność właściwa rozmnażającej się frakcji biomasy

D - szybkość rozcieńczania, h^{-1}

F - objętość reaktora biochemicznego, m^3

K_m - stała Michaelisa

O_v - obciążenie substratowe reaktora, kg ChZT.m^{-3}.d^{-1}

O_x - obciążenie substratowe osadu czynnego, kg ChZT.kg sm^{-1}.d^{-1}

Q - ilość dopływającej pożywki, m^3.h^{-1}

S - stężenie substratu w reaktorze, g ChZT.m^{-3}

S_e - ilość substratu w odpływie, g ChZT.m^{-3}

S_o - ilość substratu w dopływie, g ChZT.m^{-3}

T - czas zatrzymania (retencji, przebywania) w reaktorze, h

U_v - usunięcie substratu w jednostce objętości komory napowietrzania, g ChZT.m^{-3}

$U_{\%}$ - usunięcie substratu w jednostce objętości komory napowietrzania, %

V_v - szybkość zaniku (usunięcia) substratu w reaktorze, kg ChZT.m^{-3}.d^{-1}

V_x - właściwa szybkość zaniku (usunięcia) substratu w reaktorze kg ChZT .kg smo^{-1}.d^{-1}

X - zawartość osadu czynnego w reaktorze, kg sm.m^{-3}

α - nie rozmnażająca się frakcja biomasy

β - rozmnażająca się frakcja biomasy

μ - szybkość wzrostu, h^{-1}

σ - przedział (granice) ufności.

1. WSTĘP

Złożoność reakcji biochemicznych zachodzących podczas biodegradacji związków organicznych przy udziale mieszanych populacji drobnoustrojów osadu czynnego stwarza potrzebę wprowadzenia do opisu i modelu kinetyki tych procesów pojęcia aktywności fizjologicznej. Pozwalałoby to na uchwycenie ogólniejszych prawidłowości rządzących tymi procesami. Pomimo rozumienia wagi wpływu stanu fizjologicznego drobnoustrojów na kinetykę procesów bioinżynieryjnych, czynnik ten praktycznie nie był uwzględniany w dotychczas opracowanych modelach matematycznych ze względu na brak metod analitycznych pozwalających na wiarygodne oznaczanie aktywności drobnoustrojów prowadzących te procesy. Rozpatrzenie podstaw procesów biologicznych zachodzących w komórkach uzasadnia wykorzystanie do określenia stanu fizjologicznego pomiarów aktywności enzymów oddechowych, syntezy związków wysokoenergetycznych (ATP) i kwasów nukleinowych [40, 41]. Uwzględnienie wad i zalet tych oznaczeń oraz bezwładności biologicznej poszczególnych przemian biochemicznych w komórce sugeruje, że dogodnym miernikiem ogólnej aktywności drobnoustrojów mogą być pomiary aktywności enzymów oddechowych za pomocą sztucznych akceptorów atomów wodoru [35, 37, 41]. Jednakże przeprowadzone badania nie przynosiły do tej pory zadowalających wyników. Winę za ten stan można obarczyć brak właściwej metodyki analitycznej oznaczania aktywności enzymów oddechowych. Dopiero weryfikacja poszczególnych etapów postępowania analitycznego i stosowanych modyfikacji, dokonana w pracach wcześniejszych, [38, 43, 44] pozwoliła na opracowanie takiej metodyki.

Wprowadzenie metodycznych usprawnień oznaczania aktywności enzymów oddechowych za pomocą testu TTC stanowiło zachętę do wykorzystania tego oznaczenia do śledzenia ciągłego procesu osadu czynnego. Zamierzano tym sposobem uchwycić ogólniejsze, a jednocześnie oparte na podstawach biochemicznych, prawidłowości tego procesu, zależne od fizjologicznych cech wykorzystywanych populacji drobnoustrojów. Zamierzano też opracować równania kinetyki biodegradacji związków organicznych metodą osadu czynnego w oparciu o określony eksperymentalnie stan fizjologiczny mikroorganizmów.

Celem zasadniczych doświadczeń było ustalenie zależności pomiędzy oznaczaną aktywnością dehydrogenaz mikroorganizmów a podstawowymi wielkościami charakteryzującymi proces osadu czynnego - obciążeniem substratowym oraz szybkością usuwania substratu. Zamierzano to osiągnąć w oparciu o własne doświadczenie, jak również uwzględniając rezultaty uzyskane w nielicznych pracach innych autorów, których wyniki nie były z tego punktu widzenia interpretowane.

2. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

2.1. Modele matematyczne procesu osadu czynnego

Mikrobiologiczne procesy degradacji związków organicznych występujących w przemysłowych i bytowo-gospodarczych wodach odpadowych wykorzystywane są w bioinżynierii sanitarnej od kilkudziesięciu lat. Chociaż wzorowane są one na zachodzących w przyrodzie procesach samooczyszczania, których mechanizm jest dość dobrze poznany, istnieje brak rozeznania co do fizjologicznych właściwości wykorzystywanych w bioinżynierii sanitarnej mieszanych populacji drobnoustrojów i wpływu tych właściwości na efekty procesów biodegradacji. Trudności w tym względzie wynikają ze zmienności drobnoustrojów i zależności charakteru prowadzonych przez nie procesów od dużej liczby czynników ekologicznych i wewnątrzkomórkowych.

Szczególnie kłopotliwy i pracochłonny jest opis matematyczny procesów zachodzących przy udziale mieszanych populacji drobnoustrojów. Taka sytuacja występuje podczas oczyszczania wód odpadowych metodą osadu czynnego, gdzie dominującą rolę pełnią zooglealne skupiska bakteryjne o zróżnicowanym składzie [9, 54]. Wielu autorów stara się wyprowadzić nowe wzory opisujące kinetykę procesu osadu czynnego, dochodząc do wniosku, iż wymagają tego dane eksperymentalne, niezgodne z dotychczas sformułowanymi modelami procesu [11, 54]. Mnogość danych doświadczalnych i uzyskiwanych na ich podstawie modeli matematycznych wymaga aktualnie syntezy i uchwycenia ogólnych prawidłowości rządzących kinetyką procesu osadu czynnego.

Duże znaczenie praktyczne miałoby opracowanie bardziej uniwersalnego modelu matematycznego opisującego ten proces. Ten syntetyczny wzór nie powinien zawierać dużej ilości współczynników. Właśnie uwzględnienie zbyt dużej liczby różnorodnych parametrów jest powodem tworzenia ciągle nowych równań kinetyki procesu osadu czynnego, gdyż wśród autorów brak zgodności co do wagi wpływu poszczególnych czynników na procesy biodegradacji. W zależności więc od tego, co dany badacz uważa za parametr decydujący - obciążenie substratowe, czas aeracji, warunki tlenowe lub ilość drobnoustrojów - zaleca się różnorodne wzory, uwzględniające ich wpływ. Nawet najbardziej rozbudowany wzór matematyczny nie odda jednak w pełni przebiegu złożonych procesów, jakie zachodzą w organizmach żywych. Uwzględnienie w modelu kinetycznym wszystkich zależności pomiędzy środowiskiem a metabolizmem komórki jest praktycznie niemożliwe, a jeszcze częściej - niecelowe. W wielu przypadkach nie jest potrzebna dokładność obliczeń ilościowych, wystarcza natomiast jakościowy obraz zjawisk oraz możliwość przewi-

dywania charakteru przebiegu zjawiska z chwilą zmiany warunków środowiskowych hodowli.

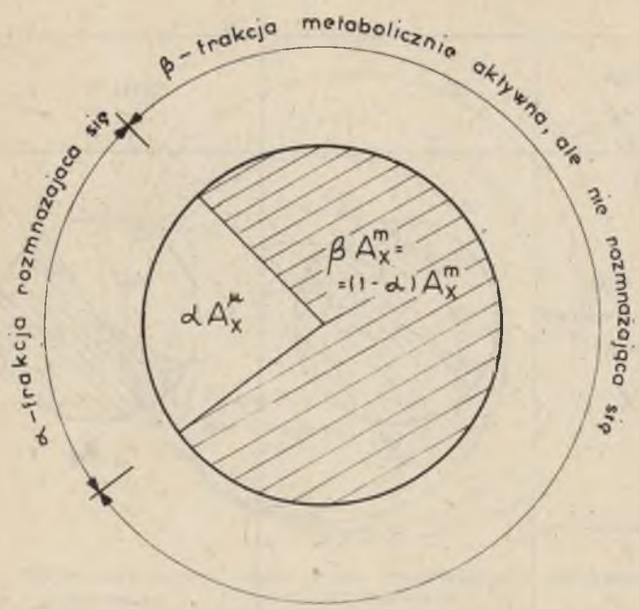
Uwzględniając przedstawiony punkt widzenia dojść można do wniosku, iż ciągle jeszcze najbardziej prawidłowy opis kinetyki procesów mikrobiologicznych, również dla mieszanych populacji bakteryjnych osadu czynnego, uzyskać można za pomocą klasycznego równania Michaelisa-Menten [33]. Podstawowym jednakże mankamentem modeli matematycznych opisujących kinetykę procesu biodegradacji, w tym także równania Michaelisa-Menten, jest nieuwzględnienie w nich aktualnego stanu fizjologicznego drobnoustrojów prowadzących te procesy. Uwzględnienie tego stanu jest koniecznością wynikającą z faktu, iż nawet bardzo ścisłe zachowanie identycznych parametrów technicznych nie zapewnia powtarzalności uzyskiwanych rezultatów. Wprowadzenie więc do równań kinetyki procesów, powodowanych przez mieszane populacje drobnoustrojów, współczynnika uwzględniającego ten stan wydaje się uzasadnione. Znaczenie fizjologicznych cech drobnoustrojów rozkładających związki organiczne podkreślano już wcześniej, jednak do tej pory nie uwzględniono tej wielkości w matematycznym opisie przebiegu procesu osadu czynnego [10].

2.2. Ocena stanu fizjologicznego mikroorganizmów za pomocą testu TTC

Niewątpliwie główną cechą określającą stan fizjologiczny mikroorganizmów będzie aktywność biologiczna (fizjologiczna), rozumiana jako zdolność do pobierania i metabolizowania określonych substancji oraz wydzielania z komórek niektórych metabolitów. Tak zdefiniowana aktywność mikroorganizmów powinna więc korelować z szybkością zaniku substratu ze środowiska.

Na ogólną aktywność fizjologiczną drobnoustrojów osadu czynnego składa się aktywność komórek rozmnażających się oraz tej części drobnoustrojów, która jest wprawdzie metabolicznie czynna, ale nie posiada zdolności do replikacji (rys. 1). Takie rozróżnienie właściwości fizjologicznych drobnoustrojów poszczególnych frakcji kłaczków osadu czynnego może być pomocne w wyjaśnieniu przyczyn uzyskiwania odmiennych rezultatów oznaczania aktywności dehydrogenaz w przeliczeniu na jednostkę biomasy drobnoustrojów osadu czynnego, pomimo iż nastąpiło zużycie substratu takiej samej wielkości. Może to być spowodowane przez zmianę wielkości poszczególnych frakcji osadu czynnego, bez zmiany jego biomasy (rys. 2).

Jest rzeczą oczywistą, iż oceny ogólnego stanu fizjologicznego drobnoustrojów można dokonać jedynie w oparciu o pomiar tych procesów, które mają zasadnicze znaczenie dla całej komórki mikroorganizmu. Z tego powodu szczególne znaczenie mają procesy biochemicznego utleniania zachodzące z udziałem enzymów łańcucha oddechowego, gdzie zbiegają się szlaki

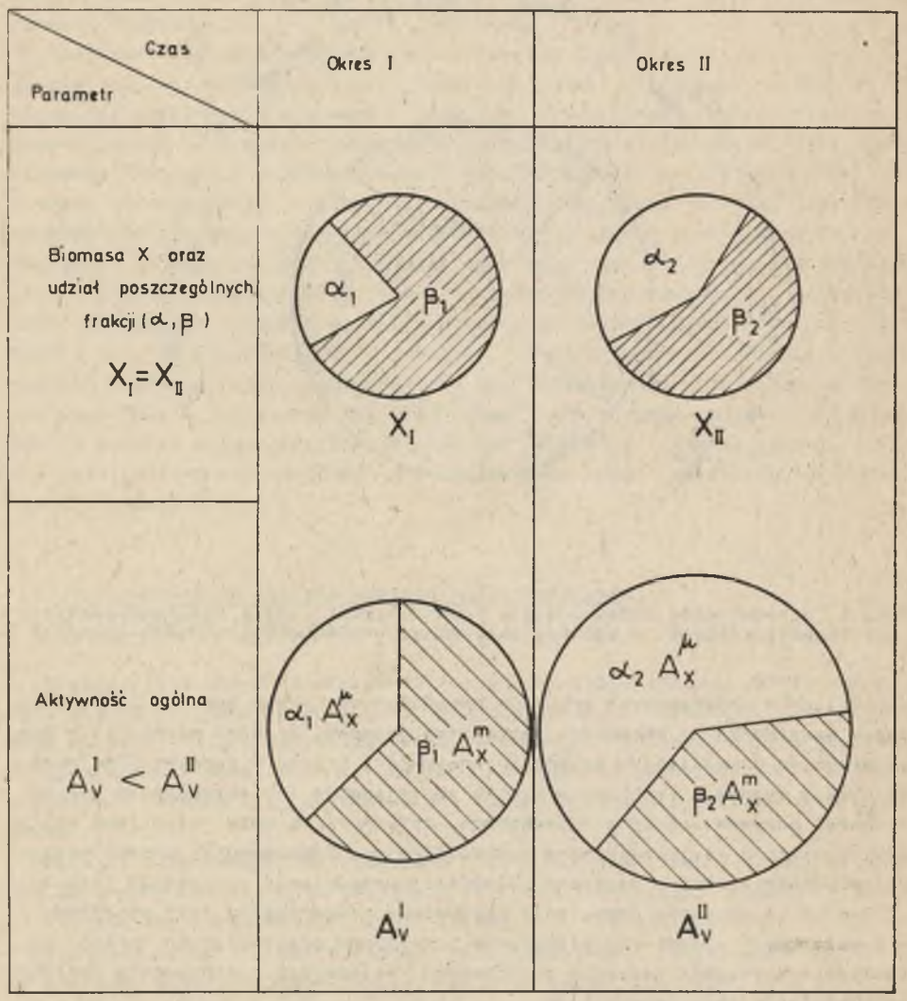


Rys. 1. Schematyczny obraz udziału rozmnażającej się i nie rozmnażającej się frakcji komórek w ogólnej aktywności drobnoustrojów osadu czynnego

metaboliczne podstawowych procesów prowadzonych przez komórki żywe. Dlatego, uwzględniając określone następstwa czasowe, przyjąć można, iż w ciągu przemian powodujących zmiany intensywności procesów życiowych najwcześniejszym sygnałem tych zmian będzie zmniejszenie lub zwiększenie się aktywności enzymów łańcucha oddechowego. Aktywność ta może więc być miarą ogólnego stanu fizjologicznego drobnoustrojów. Podsumowując przeprowadzone rozumowanie, można omawiane zależności przedstawić graficznie (rys.3).

Jednym ze sposobów oznaczania aktywności dehydrogenaz jest wykorzystanie sztucznych akceptorów elektronów i protonów przejmujących funkcję naturalnych koenzymów łańcucha oddechowego. Najszersze zastosowanie do tego celu znalazły sole tetrazolowe.

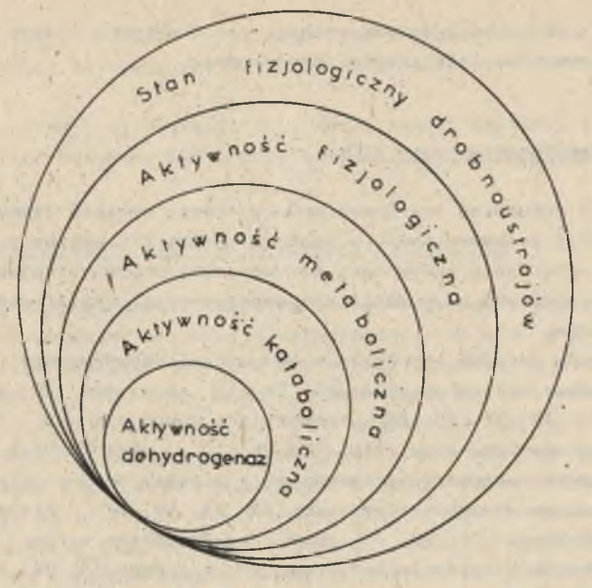
Początkowo związki te były wykorzystane do wewnątrzkomórkowej lokalizacji dehydrogenaz [13, 47, 52]. W badaniach cytochemicznych i histochemicznych wykorzystuje się różne sole tetrazolowe. O wyborze rodzaju soli decyduje zdolność do pobierania wodoru w warunkach konkurencji z układem koenzymów łańcucha oddechowego, która zależy od wielkości potencjału oksydoredukcyjnego tej soli [19]. Ponieważ wartość potencjału oksydoredukcyjnego poszczególnych soli tetrazolowych jest dość różna, przez dobór odpowiedniego związku można ocenić aktywność i lokalizować dehydrogenazy określonych substratów [15, 58, 67]. Do oceny ogólnej aktywności dehydrogenaz należy jednak stosować związek chemiczny, którego potencjał oksydo-



Rys. 2. Zmiany aktywności metabolicznej drobnoustrojów osadu czynnego przy niezmiennej ilości biomasy

redukcyjny byłby taki, aby jego redukcja następowała przy współudziale koenzymów łańcucha oddechowego. Jedynie wówczas możliwe jest uchwycenie ogólnej intensywności procesów oddechowych, których pierwszy etap zachodzi wprawdzie przy współudziale specyficznych dehydrogenaz, ale odłączone od różnych substratów i metabolitów pośrednich atomy wodoru transportowane są dalej wspólnie w łańcuchu oddechowym.

Związkiem, który spełnia wymienione wymogi, jest jeden z najprostszych tetrazoli - chlorek 2,3,5-trójfenylotetrazolowy (TTC), o potencjale oksy-



Rys. 3. Zakres pojęciowy stosowanej nomenklatury dotyczącej aktywności drobnoustrojów

oboredukcyjnym takiej wielkości, iż w szeregu naturalnych przenośników łańcucha oddechowego jest on umiejscowiony pomiędzy ubichononem a układem cytochromowym [66]. TTC nie nadaje się do doświadczeń nad wewnątrzkomórkową lokalizacją dehydrogenaz, gdyż dość wolno wnika do komórek, a powstający formazan (TF) jest rozpuszczalny w lipidach oraz posiada tendencję do krystalizowania [46]. Ta ostatnia cecha powoduje, że pierwotne miejsca, w których ukazuje się formazan, mogą odpowiadać lokalizacji miejsc aktywności oksydoredukcyjnej, ale powstające następnie duże drugorzędne ziarna są topograficznie nieprawidłowe [66]. Jednakże wymienione cechy TTC dyskwalifikujące ten związek, jeśli chodzi o przydatność do celów cytochemicznych, nie przeszkadzają w jego wykorzystaniu do oceny ogólnej aktywności fizjologicznej komórek. Z tego punktu widzenia TTC posiada kilka innych cech negatywnych. Wymienić tutaj można samoistne powstawanie formazanu pod wpływem światła oraz tworzenie się tak zwanego foto-TTC [57], a równocześnie odbarwianie roztworów formazanu w różnych rozpuszczalnikach [20] lub też toksyczność soli tetrazolowych [19].

Pomimo tych niedogodnych właściwości TTC, oznaczanie aktywności dehydrogenaz w oparciu o ten związek, nazwane testem TTC, znalazło dość szerokie zastosowanie wśród sposobów oceny stanu fizjologicznego mikroorganizmów [1, 21, 55, 56]. Istnieją jednak ograniczenia stosowalności tego tekstu, a ich znajomość pomaga w racjonalnym jego wykorzystaniu. Zasadnicze znaczenie ma na przykład szybkość wnikania TTC do komórek, co może być ważnym czynnikiem ograniczającym stosowanie tej metody, zarówno podczas

określania aktywności enzymatycznej, jak również w czasie doświadczeń nad wewnątrzkomórkową lokalizacją dehydrogenaz.

2.3. Modyfikacja testu TTC

Jedno z utrudnień szerszego wykorzystania wyników oceny aktywności fizjologicznej drobnoustrojów w oparciu o test TTC wynika z niemożności porównania oznaczanej aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów z różnych źródeł, ze względu na niejednolitość postępowania analitycznego poszczególnych autorów.

Stosowana metodyka oznaczania aktywności dehydrogenaz różni się uwzględnieniem wpływu światła [20, 26, 34], odczynem [20, 31, 32, 34] stężeniem TTC [26, 31, 60, 65], temperaturą inkubacji [3, 16, 32], wprowadzeniem egzogennego substratu [22, 26, 32], ekstrahentem TF [4, 37, 38, 61], rodzajem substancji przerywającej procesy enzymatyczne [22, 24, 48], uwzględnieniem warunków tlenowych [20, 22, 49, 61], mieszaniem próbek w czasie inkubacji [31, 49, 61] oraz uwzględnieniem wpływu produktów metabolizmu drobnoustrojów na aktywność enzymatyczną [3, 26, 55, 64].

Szczególnie istotnym czynnikiem, wpływającym na wiarygodność uzyskiwanych rezultatów, jest stężenie TTC w inkubowanej próbce. Wynika to stąd, iż TTC - jak wszystkie sole tetrazolowe - działa toksycznie na mikroorganizmy [3, 23]. Dlatego stężenie TTC w inkubowanej próbce jest ważnym czynnikiem wpływającym na wynik testu TTC. W przypadku zbyt dużej koncentracji TTC związek ten działa toksycznie na drobnoustroje, a zbyt małe stężenie może nie zapewnić dotarcia TTC do wszystkich miejsc, w których zachodzą procesy oksydoredukcyjne. Znaczenie doboru odpowiedniego stężenia TTC podczas oznaczenia aktywności dehydrogenaz osadu czynnego nie było należycie doceniane. Najczęściej przyjmuje się jako optymalne i stałe stężenie TTC zaproponowane przez Lenharda [31]. Tymczasem zróżnicowanie składu jakościowego, struktury kłaczków osadu czynnego i stanu fizjologicznego mikroorganizmów powoduje, iż stężenie to będzie zmienne [39]. Dlatego przed przystąpieniem do oznaczania aktywności dehydrogenaz należy każdorazowo wyznaczyć optymalne stężenie TTC w inkubowanych próbkach [42].

Część badaczy zaleca, aby do oznaczeń używać roztworów TTC z dodatkiem glukozy, co ma zapewnić uzyskiwanie wyników w warunkach substratowego oddychania drobnoustrojów [22, 27, 32]. Ponieważ wiąże się to często z uaktywnieniem dehydrogenaz nieswoistych w badanym procesie biodegradacyjnym, bardziej wiarygodny obraz aktywności enzymatycznej można uzyskać stosując roztwory bez dodatku tego egzogennego substratu. Uaktywnienie dehydrogenaz uczestniczących w rozkładzie glukozy zależy od szeregu czynników a przede wszystkim od tego, do jakiego substratu przystosowane były mikroorganizmy. Zróżnicowanie stopnia uaktywnienia mikroorganizmów w zależności od stosowanego substratu egzogennego ukazują rezultaty uzyskane

przez Klapwijka [22]. Stosując różne substraty wprowadzane do inkubowanych próbek, uzyskał on także zróżnicowany efekt zależny od źródła mikroorganizmów.

Pomimo ciągle trwającej dyskusji dotyczącej samej metodyki anylitycznej, test TTC wykorzystywany był z pożytkiem w wielu doświadczeniach.

2.4. Zastosowanie testu TTC w bioinżynierii sanitarnej

W technologii biologicznego oczyszczania wód odpadowych szersze zastosowanie testu TTC do oceny aktywności dehydrogenaz datuje się od końca lat pięćdziesiątych i wiąże się z pracami Lenharda oraz Bucksteega i Thielego. Lenhard [27] w pierwszych swych pracach wykazał, iż test ten jest dogodnym wskaźnikiem aktywności gleb. Potem stwierdził [28], iż oznaczana tym sposobem aktywność dehydrogenaz rzecznych osadów dennych jest proporcjonalna do sumy dostępnych źródeł węgla i azotu. Zaproponował następnie wykorzystanie testu TTC do oceny toksycznego wpływu określonych związków na mikroorganizmy glebowe [29]. Jednakże omówione doświadczenia dotyczyły pogranicza obszarów zainteresowań bioinżynierii sanitarnej. Dopiero wykonane przez Lenharda w 1964 r. [30] lakonicznie zreferowane badania wykazały, jak użyteczny może być test w ocenie toksycznego działania różnych substancji na mieszane populacje drobnoustrojów wykorzystywane w procesie oczyszczania wód odpadowych. Potwierdziły one, że za pomocą określenia aktywności dehydrogenaz stwierdza się toksyczne działanie jakiegoś czynnika o wiele wcześniej niż za pomocą pomiarów zmniejszenia stopnia rozkładu zanieczyszczeń i pogorszenia jakości oczyszczania wód odpadowych.

Wniosek ten jest podobny do stwierdzeń Bucksteega i Thiele [4]. Badacze ci już w roku 1958 zaproponowali wykorzystanie TTC dla ułatwienia zliczania bakterii hodowanych na płytkach [2], a w następnym roku - dla lepszej charakterystyki procesu osadu czynnego [3].

Najwięcej badań przeprowadzono wykorzystując test TTC do oceny toksycznego działania określonych substancji na mieszane populacje bakteryjne [3, 22, 34, 42]. Wszechstronne doświadczenia pod tym względem prowadzili Wellens i Zahn [64].

W wynikach doświadczeń uzyskanych przez wymienionych autorów zwraca uwagę potwierdzenie za pomocą testu TTC faktu podwyższenia aktywności metabolicznej drobnoustrojów wskutek działania inhibitora w stężeniu poprzedzającym bezpośrednio efekt toksyczny [64]. Podobne wyniki uzupełnione pomiarami zużycia tlenu w aparacie Warburga uzyskali Pawlaczyk-Szpilowa, Moskal i Wertelik [50]. Ponieważ efekt ten występował we wszystkich badanych przypadkach, autorzy ci proponują uznać go za informację o obecności czynnika toksycznego w stężeniach podprogowych, graniczących z dawkami powodującymi objawy toksyczne.

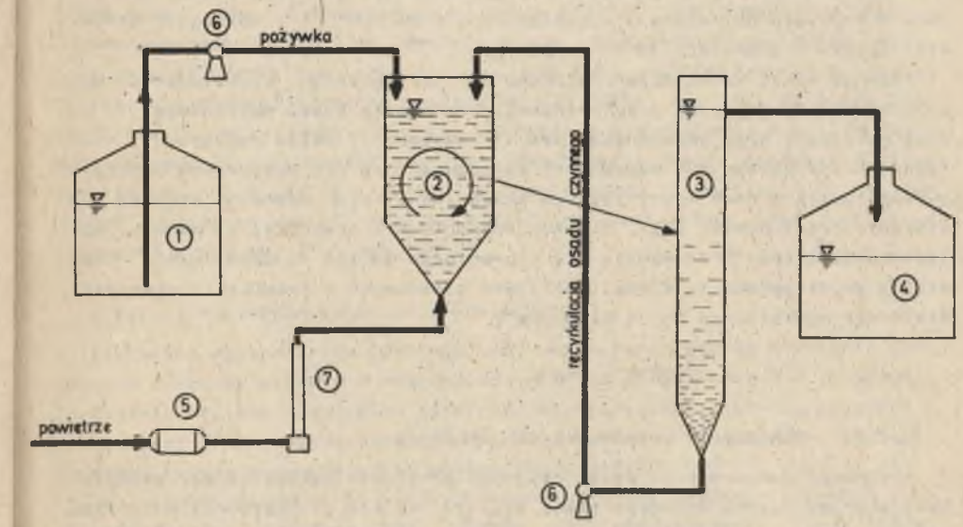
Z technologicznego punktu widzenia ciekawsze jednak są doświadczenia zmierzające do wykorzystania testu TTC do oceny fizjologicznej aktywności drobnoustrojów, prowadzących procesy biodegradacji przy ciągłym dopływie substratu. Możliwości, jakie istnieją pod tym względem, dostrzegało wielu autorów [1, 55, 56], jednakże stwierdzić należy, iż uzyskano niewiele miarodajnych wyników. Najczęściej usiłowano znaleźć zależność pomiędzy obciążeniem substratowym drobnoustrojów a aktywnością dehydrogenaz [5, 21]. W badaniach tych stwierdzono korelację pomiędzy tymi wielkościami, jednakże jej przebieg zależny był od rodzaju substratów ulegających biodegradacji. Przy czym, o ile Kałmykowa, Lazarowa, Rogovskaja, Skidrov i Tichaja [21] stwierdzali zawsze przyrost aktywności dehydrogenaz ze wzrostem obciążenia, to Buraczewski [5] uzyskał bardziej zróżnicowany przebieg tych zależności. Jednakże do wyjaśnienia przyczyn uzyskiwania takich rezultatów brak dostatecznej ilości danych. Wynikać to mogło bowiem zarówno z samego mechanizmu reakcji enzymatycznych (hamowanie substratowe lub nadmiar produktu), jak również toksycznego działania poszczególnych składników pożywki lub też zmian w stopniu adaptacji drobnoustrojów do tych składników.

3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

3.1. Metodyka badań

3.1.1. Materiał badań i warunki hodowli drobnoustrojów

W przeprowadzonych doświadczeniach materiałem zaszczepiającym był osad denny z osadnika wstępnego oczyszczalni miejskiej w Gliwicach. Badania prowadzono w układach modelowych składających się z komory napowietrzania o objętości 3 dm^3 oraz osadnika takiej samej objętości (rys. 4). Pożywkę przygotowywano raz w ciągu doby i dozowano pompą perystaltyczną. Intensywność napowietrzania tak regulowano, aby zapewnić zawartość rozpuszczonego tlenu nie mniejszą niż 1 mg/dm^3.



Rys. 4. Schemat instalacji modelowej do ciągłej hodowli drobnoustrojów osadu czynnego

1 - pożywka, 2 - komora reakcji, 3 - osadnik, 4 - wody oczyszczone, 5 - sprężarka, 6 - pompa perystaltyczna, 7 - rotametr

Adaptację drobnoustrojów osadu czynnego prowadzono w sposób ciągły dozując odpowiednio rozcieńczoną pożywkę w takiej ilości, aby czas zatrzymania w reaktorze wynosił 24 godziny, a obciążenie substratowe osadu czyn-

nego było rzędu 0,1 g ChZT/gsm.d. Oprócz przyswajalnego źródła węgla, pożywka zawierała nieograniczone związki azotu i fosforu w takiej ilości aby stosunek ChZT:N:P wynosił 100:5:1. W dopływającej pożywce oraz w dopływie oznaczano codziennie ChZT oraz odczyn. Natomiast własności osadu czynnego kontrolowano za pomocą oznaczeń zawiesiny ogólnej, mineralnej, opadalności oraz aktywności dehydrogenaz.

Po stwierdzeniu adaptacji drobnoustrojów do rozkładu substratów, podwyższano stopniowo obciążenie substratowe przez zwiększenie stężenie substratu w dopływającej pożywce. Równocześnie skracano czas aeracji, aż do osiągnięcia 3-godzinnego czasu zatrzymania w komorze napowietrzania. Zawartość osadu czynnego wynosiła przeciętnie 3 do 4 osm/dm^3. Stężenie osadu czynnego regulowano usuwając jego nadmiar.

Wykonano kilka serii doświadczeń różniących się głównie rodzajem substratu przyswajalnego przez drobnoustroje. W pierwszej serii badań jedynym przyswajalnym źródłem węgla był fenol. Stężenie fenolu w dopływającej pożywce wynosiło od 75 do 100 g/m^3 w zależności od wymaganego obciążenia substratowego mikroorganizmów osadu czynnego. Następną, znacznie obszerniejszą serię wykonano równolegle w dwóch układach modelowych, w których w jednym substratem był również fenol, a w drugim glukoza. Zawartość fenolu w dopływie do reaktora wynosiło od 100 do 500 g/m^3, natomiast stężenie glukozy w granicach od 50 do 250 g/m^3.

Trzecią serię doświadczeń wykonano z wykorzystaniem rzeczywistych wód odpadowych powstających przy produkcji bezwodnika kwasu maleinowego (I układ modelowy) oraz bezwodnika kwasu ftalowego (II układ modelowy). Niejednorodność składu wód odpadowych powodowała, że nie wykonywano oznaczeń występujących w nich specyficznych składników, ale oceniano ogólnie ich stężenie przez pomiar ChZT. Dla wód odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego wartość ChZT wahała się w granicach od 185 do 1299 g/m^3. Chemiczne zapotrzebowanie tlenu (ChZT) wód odpadowych z produkcji bezwodnika ftalowego wynosiło od 95 do 1190 g/m^3.

3.1.2. Oznaczenia analityczne

3.1.2.1. Oznaczenie aktywności dehydrogenaz

Aktywność dehydrogenaz osadu czynnego oznaczano wykorzystując zmodyfikowaną przez autora metodykę testu TTC [39, 43, 44]. Każdorazowo przed przystąpieniem do właściwych doświadczeń z zespołem drobnoustrojów osadu czynnego, pochodzącego z innego źródła, określano optymalne stężenie TTC, zapewniające uzyskanie maksymalnych wyników oznaczeń [39, 43]. W tym celu do kolejnych próbek z 20 cm^3 zawiesiny drobnoustrojów osadu czynnego, pobranego z komór napowietrzania, wprowadzono po 1 dm^3 0,2% roztworu Na_2SO_3 (celem stworzenia warunków beztlenowych) oraz po 1 cm^3 roztworu TTC o stężeniu 0; 5; 1; 1,5; 2; 3; 4 i 6%, uzyskując tym sposobem różne stężenie końcowe TTC w próbkach. Po 30 minutach inkubacji próbki sączono i

eluowano wytworzony TF metanolem aż do zupełnego jego wymycia (zbierano kilka kropel przesączu sprawdzając, czy są bezbarwne). Wykreślona na podstawie pomiarów zabarwienia przesączów zależność między ekstynckją a stężeniem roztworu TTC wskazywała optymalne stężenie stosowanych roztworów tego związku. Uwzględniając zmienność składu i stanu fizjologicznego mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego, okresowo powtarzano wyznaczanie optymalnej dawki TTC.

Ostatecznie tok postępowania analitycznego, po uprzednim wyznaczeniu optymalnego stężenia TTC w inkubowanych próbkach, obejmował następujące czynności:

Do probówek wprowadzano 20 cm^3 zawiesiny drobnoustrojów osadu czynnego z komór napowietrzania, dodawano po 1 cm^3 0,2% roztworu Na_2SO_4 oraz po 1 cm^3 roztworu TTC o wyznaczonym stężeniu optymalnym. Próbki inkubowano w ciemności przez okres zależny od aktywności drobnoustrojów, a jednocześnie mieszczący się w zakresie liniowego przyrostu TF w czasie inkubacji (najczęściej od 30 minut do 1 godziny). Następnie próbki szybko sączono, a osad na saczku przemywano taką ilością metanolu, aby uzyskać zupełne odbarwienie kłaczków osadu czynnego (najczęściej wystarczało 25 cm^3). Przesącz zbierano do suchych probówek. W trakcie tych czynności zwracano uwagę na to, aby wprowadzenie roztworu TTC do inkubowanych próbek i przemywanie osadu metanolem odbywało się w takim tempie, aby okres czasu, jaki upłynął między tymi czynnościami, był taki sam. Ekstynkcję przesaczu oznaczano w spektofotometrze Specord UV VIS przy długości fali 485 nm. Zawartość TF odczytywano z wykresu wzorcowego i określano w miligramach wytworzonego TF z jednostki objętości zawartości komor napowietrzania w określonym czasie (mg TF . $dm^{-3}h^{-1}$). Uwzględniano także ilość biomasy w próbce i podawano wyniki oznaczeń w mg TF na gram suchej masy osadu i jednostkę czasu (mg TF . $gsm^{-1}.h^{-1}$).

3.1.2.2. Pozostałe oznaczenia analityczne

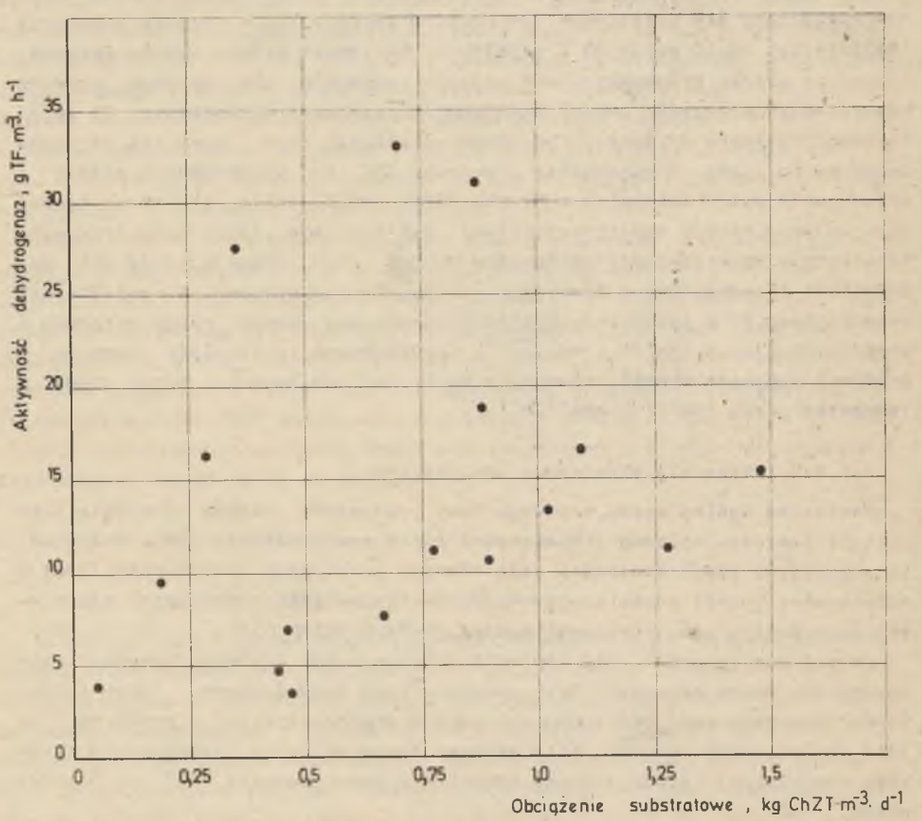
Zawiesinę ogólną osadu czynnego (sm) oznaczano metodą pośrednią jako różnicę pomiędzy sączoną i niesączoną suchą pozostałością [14]. Suchą masę organiczną (smo) oznaczano jako różnicę strat przy prażeniu sączonej i niesączonej suchej pozostałości [14]. Chemiczne zapotrzebowanie tlenu oznaczano metodą dwuchromianową według PN-74/C-04578 [17].

Oprócz wymienionych, dla kontroli procesu osadu czynnego wykonano także szereg innych oznaczeń (BZT_5, odczyn, tlen rozpuszczony, formy azotu, fosforany, zawartośc DNA i RNA w biomasie drobnoustrojów) i pomiarów (ilość dopływającej pożywki, intensywność napowietrzania, temperatura, szybkość recyrkulacji osadu), które jednak nie będą omawiane w niniejszej pracy.

3.2. Wyniki badań

3.2.1. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego I seria badań

Badania zmierzające do ustalenia współzależności pomiędzy aktywnością fizjologiczną mikroorganizmów a kinetyką biodegradacji prowadzono przez kilka lat. Rysunek 5, przedstawiający przykładowo rezultaty jednych z najwcześniej wykonanych doświadczeń, jest obrazem niezgodności oczekiwań i rzeczywistości. Nie stwierdzono bowiem korelacji pomiędzy badanymi wielkościami. Obserwacje te prowadzono w układzie modelowym o przepływie ciągłym z zawiesiną drobnoustrojów osadu czynnego hodowaną w syntetycznej pożywce z fenolem jako jedynym substratem organicznym. Parametry techno-



Rys. 5. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria I. Wielkości oznaczanej aktywności dehydrogenaz w zależności od obciążenia substratowego (brak korelacji)

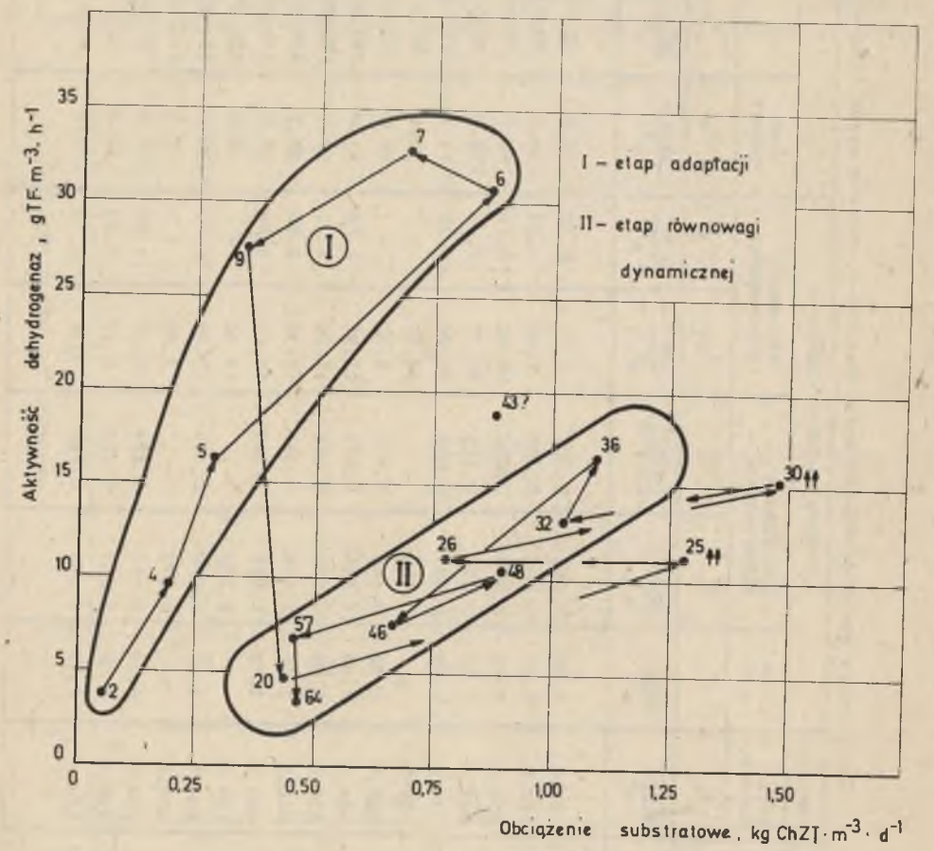
Tabela 1

Charakterystyka procesu biodegradacji fenolu metodą osadu czynnego (seria I)

Lp.	Dzień dośw.	Dopływ	Komora napowietrzania						Odpływ					
		Stęż. substr.	Ilość osadu	Obciążenie substratowe		Aktywność dehydrogenaz		Stęż. substr.	Usunięcie substratu					
	d	S_o gChZT/m³	X kgsm/m³	O_v kgChZT/m³·d	O_x kgChZT/kgsm·d	A_v gTF/m³·h	A_x gTF/m³	S_e gChZT/m³	U_v gChZT/m³	U_x %	V_v kgChZT/m³·d	V_x kgChZT/kgsm·d
1	2	28,0	7,75	0,050	0,007	3,72	0,48	16,0	12,0	43	0,021	0,003
2	4	110,0	7,55	0,194	0,025	9,06	1,20	64,0	46,0	42	0,082	0,010
3	5	150,0	7,33	0,264	0,036	16,02	2,22	86,0	65,0	43	0,113	0,015
4	6	242,0	7,42	0,854	0,115	30,72	4,20	178,0	64,0	26	0,225	0,031
5	7	194,5	8,48	0,687	0,081	35,90	4,26	81,5	113,0	58	0,399	0,047
6	9	99,0	-	0,350	-	27,50	-	39,5	59,5	60	0,210	-
7	20	126,0	2,83	0,445	0,157	5,32	-	60,0	66,0	52	0,233	0,082
8	25	364,5	4,69	1,286	0,274	11,52	2,46	83,0	281,5	77	0,993	0,212
9	26	218,0	3,07	0,770	0,251	11,00	3,51	68,0	150,0	69	0,530	0,173
10	30	418,5	3,16	1,476	0,467	15,36	4,86	86,5	332,0	79	1,171	0,370
11	32	288,0	3,39	1,016	0,300	13,02	3,84	97,5	122,0	42	0,671	0,198
12	36	239,0	-	1,100	-	14,50	-	0,0	239,0	100	0,850	-
13	43	248,5	3,14	0,878	0,279	18,96	6,00	134,0	114,5	46	0,405	0,129
14	46	191,0	-	0,675	-	7,50	-	37,0	145,0	76	0,512	-
15	48	252,5	2,10	0,890	0,424	10,20	4,86	101,0	51,5	20	0,534	0,228
16	57	128,5	2,06	0,454	0,220	6,72	3,24	30,5	98,0	76	0,347	0,168
17	64	134,0	2,10	0,472	0,225	3,12	1,50	76,5	57,5	43	0,202	0,096

logiczne procesu były typowe dla konwencjonalnego sposobu prowadzenia procesu osadu czynnego (tab. I). Średnia zawartość osadu czynnego w komorach napowietrzania wynosiła 4,76 kg sm/m^3, natomiast średnie obciążenie substratowe odpowiadało 0,685 kg ChZT/m^3.d, co w przeliczeniu na jednostkę biomasy osadu czynnego dawało wartość 0,144 kg ChZT/kg sm.d.

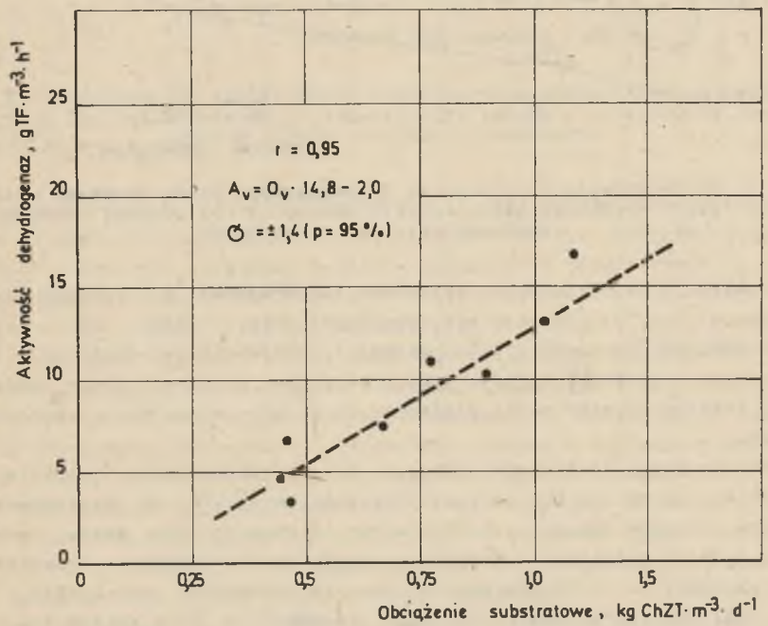
Uzyskane wyniki doświadczeń nie zachęcały do dalszych badań nad ustaleniem wpływu stanu fizjologicznego drobnoustrojów, ocenianego za pomocą oznaczania aktywności dehydrogenaz, na otrzymane efekty biologicznego oczyszczania. Na ich podstawie nie można było znaleźć jakiejkolwiek korelacji pomiędzy oznaczaną aktywnością dehydrogenaz drobnoustrojów a szybkością zaniku substratu ze środowiska.



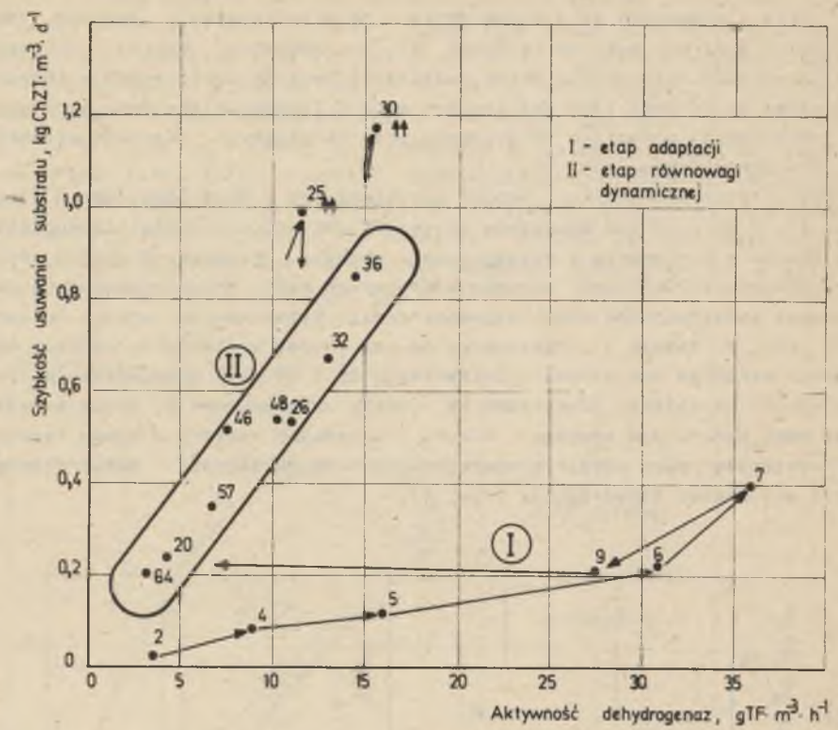
Rys. 6. Biodegradacja fenolu przez drobnoustrojeosadu czynnego - seria I. Zgrupowanie wyników oznaczeń aktywności dehydrogenaz w poszczególnych etapach rozwoju drobnoustrojów w oparciu o wykres fazowy (liczby obok punktu pomiarowego odpowiadają dniom doświadczeń)

Postęp w badaniach zanotowano dopiero po przedstawieniu wyników doświadczeń w formie wykresu fazowego [8]. Sporządzenie wykresu fazowego dla omawianych doświadczeń przez połączenie punktów pomiarowych w chronologicznej kolejności (dni doświadczeń podaje liczba umieszczona obok punktu pomiarowego) pozwoliło na wyodrębnienie określonych obszarów aktywności mikroorganizmów (rys. 6).

Obszar pierwszy obejmuje wyniki uzyskiwane do 9 dnia doświadczeń (tabela I). W okresie tym oznaczana aktywność dehydrogenaz była niewspółmiernie wysoka w porównaniu z występującą w okresie następnym. W drugim okresie doświadczeń aktywność enzymów oddechowych była proporcjonalna do obciążenia substratowego komór napowietrzania wyznaczonego przez pomiary ChZT (rys. 7, tabela I). Odstępstwa od tej zasady występowały podczas raptownych wzrostów obciążenia substratowego 25 i 30 dnia doświadczenia (nagły wzrost obciążenia zaznaczono na rysunku skierowanymi ku górze strzałkami obok punktu pomiarowego). W tych przypadkach wektory wykresu fazowego "wybiegały" poza obszar proporcjonalnych do obciążenia substratowego zmian aktywności dehydrogenaz (rys. 4).



Rys. 7. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria I. Wyodrębnione wyniki oznaczeń aktywności dehydrogenaz i obciążenia substratowego dla etapu równowagi dynamicznej (ścisła korelacja)

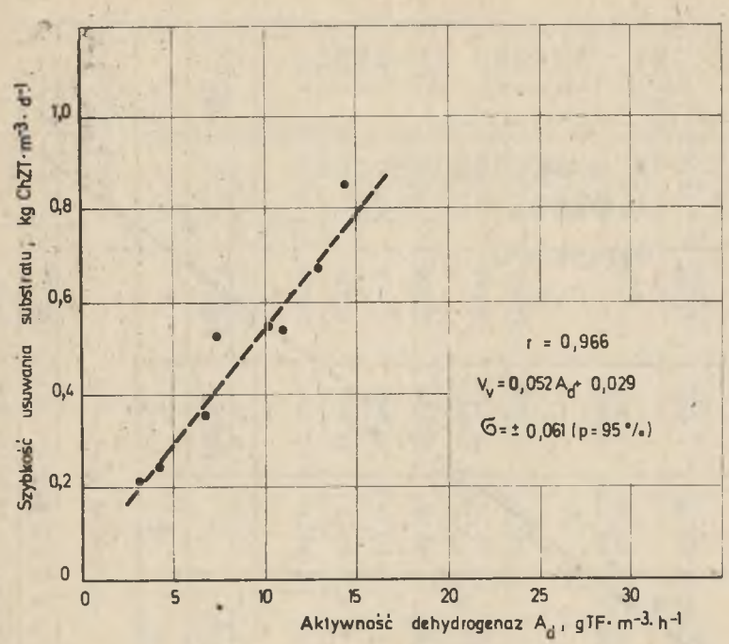


Rys. 8. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria I. Wykres fazowy szybkości biodegradacji fenolu i aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego

W układzie współrzędnych "aktywność dehydrogenaz" i "szybkość usuwania substratu" (rys. 8) ujawniły się identyczne etapy procesu, jak w układzie współrzędnych "obciążenie substratowe" i "aktywność dehydrogenaz".

Kolejny rys. 9 dokumentuje istnienie wprost proporcjonalnej współzależności pomiędzy wymienionymi wielkościami w okresie równowagi dynamicznej układu.

Przedstawione ilustracje wykazują, że w przeprowadzonych badaniach obciążenie substratowe nie osiągało wartości, przy których następowała inhibicja procesów enzymatycznych komórek drobnoustrojów osadu czynnego, przez nadmiar substratu. Przypadkowy nagły wzrost obciążenia substratowego w podanych dwóch dniach doświadczeń nie spowodował pogorszenia stanu fizjologicznego drobnoustrojów i ich aktywność w tych dniach nie uległa takim wahaniom jak obciążenie (rys. 6, tabela I). Po zmniejszeniu obciążenia występowała nadal liniowa zależność pomiędzy aktywnością oddechową drobnoustrojów a szybkością usuwania substratu (rys. 4). Znamienne jednak, że w dniach raptownego wzrostu obciążenia substratowego w przeciwieństwie

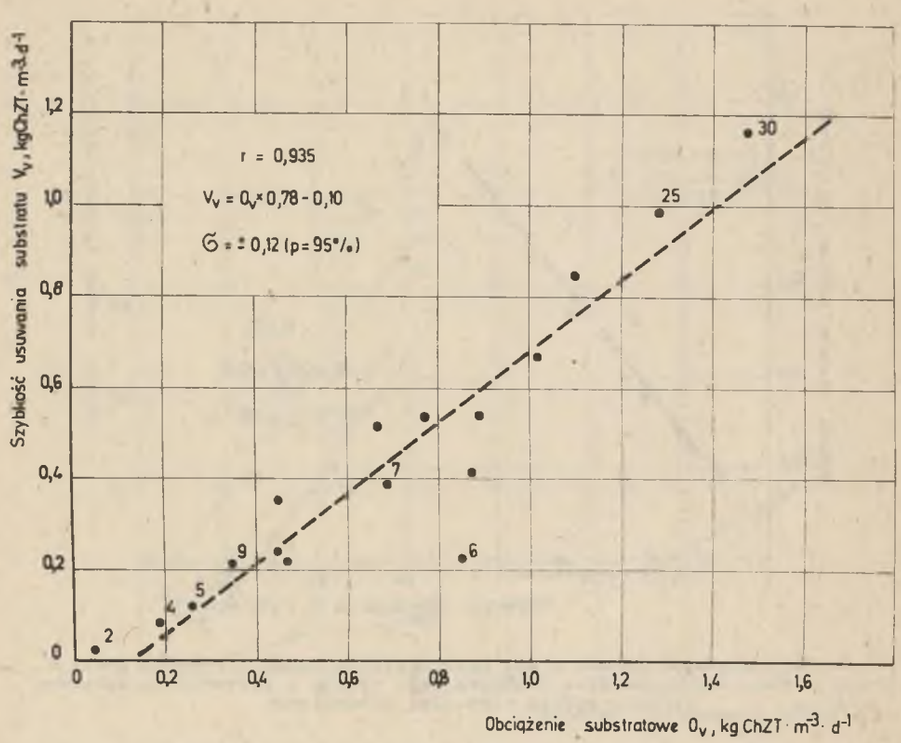


Rys. 9. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria I. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji fenolu i aktywnością dehydrogenaz w stanie równowagi dynamicznej

do zmian aktywności, szybkość biodegradacji fenolu była wprost proporcjonalna do występujących obciążeń. Przekonuje o tym rys. 10, przedstawiający w sposób tradycyjny zależność pomiędzy obciążeniem substratowym O_v a szybkością usuwania ładunku zanieczyszczeń V_v. Świadczy to o tym, że cały układ modelowy - komora aeracji, osadnik wtórny i zawarty w nim zespół drobnoustrojów osadu czynnego - wykazywał dużą stabilność spowodowaną przez sumaryczne współdziałanie zjawisk biologicznych i fizycznych.

Oznaczenia aktywności dehydrogenaz pozwalały na matematyczny opis kinetyki procesów biodegradacji. Informowały również z wyprzedzeniem w porównaniu z innymi wskaźnikami o mogących nastąpić perturbacjach w przebiegu procesu biodegradacyjnego. W omawianym przypadku tradycyjny sposób oceny przebiegu nie wykazał wpływu nagłych wzrostów obciążenia substratowego na stan fizjologiczny drobnoustrojów, gdyż szybkość zaniku substratu była dalej proporcjonalna do obciążenia. Dopiero pomiar aktywności dehydrogenaz ostrzegał, iż drobnoustroje nie były w stanie przyswoić tak znacznej ilości substratu i następowało zachwianie homeostazy układu.

Więcej informacji pod tym względem uzyskano w kolejnej serii doświadczeń nad biodegradacją fenolu (seria II) i glukozy prowadzonych przez kilka miesięcy.



Rys. 10. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria I. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji fenolu i obciążeniem substratowym

3.2.2. Biodegradacja fenolu (II seria badań) i glukozy przez drobnoustroje osadu czynnego

Biodegradację fenolu i glukozy metodą osadu czynnego zachodzącą równolegle w dwu modelach zaliczyć można było do sposobów wysokosprawnych tej metody biologicznego oczyszczania (tabela II, III, IV i V). Decyduje o tym głównie zawartość osadu czynnego w komorach aeracji, obciążenie substratowe mikroorganizmów oraz uzyskiwany stopień rozkładu związków organicznych. Średnia zawartość osadu czynnego w modelu I, w którym prowadzono biodegradację fenolu, wynosiła 9.2 kg sm/m^3 (tabela II), a w modelu II (biodegradacja glukozy) była niższa - 6,7 kg sm/m^3. Natomiast takie samo było średnie obciążenie substratowe osadu czynnego w obydwu modelach, równe 0,18 kg ChZT/kg sm.d. Zbliżone było także obniżenie zawartości związków organicznych w dopływającej pożywce. W odpływie z modelu I wynosiło

Tabela II

Charakterystyka procesu biodegradacji fenolu metodą osadu czynnego (seria II) - stężenie substratu w dopływie oraz parametry procesu

Lp.	Dzień dośw.	Dopływ		Komora napowietrzania														
						Obciążenie			Usunięcie substratu							Aktywność dehydrogenaz		
		Stężenie substr.	Stężenie substr.	Ilość osadu	O_v	O_x	U_v	U_x	V_v	V_x	A_v	A_x
	d	S_o gChZT/m^3	S gCZT/m^3	X kgsm/m^3	O_v kgChZT/m^3.d	O_x kgChZT/kgsm.d	U_v gChZT/m^3	U_x %	V_v kgChZT/m^3.d	V_x kgChZT/kgsm.d	A_v gTF/m^3.h	A_x gTF/kgsm.h
1	1	55,0	19,0	6,8	0,366	0,053	36	65,4	0,239	0,035	0,25	1,21
2	8	57,5	-	8,2	0,382	0,046	-	-	-	-	10,01	1,22
3	15	54,0	10,5	8,1	0,359	0,044	43,5	80,5	0,289	0,035	13,62	1,68
4	22	134,5	-	11,9	0,859	0,075	-	-	-	-	31,64	2,66
5	29	144,0	129,5	10,2	0,959	0,094	14,5	10,0	0,096	0,009	14,42	1,41
6	34	170,0	-	10,8	1,132	0,104	-	-	-	-	40,05	3,71
7	37	162,5	81,5	5,1	1,082	0,212	81	49,8	0,539	0,105	37,20	7,29
8	40	200,0	-	7,1	1,332	0,187	-	-	-	-	46,25	6,51
9	48	180	45,5	-	1,198	-	134,5	74,7	0,895	-	36,50	-
10	51	203,5	15,5	7,5	1,355	0,180	188	92,3	1,252	0,166	50,06	6,67
11	58	185,0	-	9,6	1,232	0,128	-	-	-	-	42,10	4,39
12	65	551,0	133,0	11,1	3,669	0,330	418	75,8	2,783	0,250	54,50	4,91
13	67	320,0	-	10,8	2,131	0,197	-	-	-	-	81,50	7,55
14	71	280	-	11,2	1,864	0,166	-	-	-	-	64,20	5,73
15	74	224,0	-	10,6	1,591	0,140	-	-	-	-	56,10	5,29
16	76	230,0	84,5	-	1,531	-	148,5	64,57	0,989	-	48,20	-
17	79	252,5	51,0	5,7	1,681	0,259	201,5	79,80	1,341	0,225	-	-
18	81	365,0	-	6,2	2,430	0,392	-	-	-	-	86,50	13,95
19	83	390,5	-	8,4	2,600	0,309	-	-	-	-	101,00	12,02
20	86	321,5	70,5	10,3	2,141	0,207	251,5	78,25	1,674	0,162	75,32	7,31
21	90	410,5	85,5	12,1	2,733	0,225	325	79,17	2,164	0,178	-	-
22	95	405,0	-	11,9	2,697	0,226	-	-	-	-	95,60	8,03

Tabela III

Charakterystyka procesu biodegradacji fenolu metodą osadu czynnego (seria II) - oznaczenia w recyrkulacie oraz uzyskiwany stopień biologicznego oczyszczania

Lp.	Dzień dośw.	Recyrkulat				Odpływ			
		Współczynnik recyr.	Stężenie substratu	Ilość osadu	Stężenie substratu	Usunięcie substratu			
			S_r	X_r	S_e	U_v	$U_{\%}$	V_v	V_x
	d	-	$\frac{g}{m^3}$	$\frac{kgsm}{m^3}$	$\frac{gChZT}{m^3}$	$\frac{gChZT}{m^3}$	%	$\frac{kgChZT}{m^3.d}$	$\frac{kgChZT}{kgsm.d}$
1	1	6,95	101,0	5,60	5,0	50	90,9	0,333	0,048
2	8	3,52	-	5,50	12,5	45	78,2	0,299	0,036
3	15	3,52	28,0	6,04	6,5	47,5	87,9	0,316	0,039
4	22	2,52	-	8,85	24,0	110,5	82,1	0,735	0,061
5	29	2,52	81,5	6,82	38,5	105,5	73,2	0,702	0,068
6	34	2,52	-	-	35,0	135	79,4	0,899	0,083
7	37	2,52	49,0	6,82	41,5	121	74,4	0,805	0,158
8	40	2,52	-	-	42,0	158	79,0	1,052	0,148
9	48	2,52	-	-	18,5	161,5	89,7	1,075	-
10	51	2,52	-	7,52	57,5	146	71,7	0,972	0,129
11	58	2,52	-	-	19,0	166	89,7	1,105	0,115
12	65	2,52	141,0	13,5	266,0	285	51,7	1,898	0,171
13	67	2,52	-	-	61,0	259	80,4	1,724	0,159
14	71	2,52	-	-	53,5	226,5	80,8	1,508	0,134
15	74	2,52	-	-	46,0	178	79,4	1,185	0,111
16	76	-	-	-	51,0	173	75,2	1,152	-
17	79	-	-	-	55,5	197	78,0	1,312	0,230
18	81	-	-	-	66,5	299	81,9	1,991	0,321
19	83	-	-	-	76,5	314	80,4	2.091	0,248
20	86	-	-	-	59,0	262,5	81,6	1,748	0,169
21	90	-	-	-	83,0	327,5	79,7	2.181	0,180
22	95	-	-	-	81,0	324	80	2,157	0,181

Tabela IV

Charakterystyka procesu biodegradacji glukozy metodą osadu czynnego - - stężenie substratu w dopływie oraz parametry procesu

Lp.	Dzień dośw.	Dopływ	Komora napowietrzania									
		Stężenie substr.	Stężenie substr.	Ilość osadu	Obciążenie		Usunięcie substratu				Aktywność dehydrogenaz	
		S_o	S	X	O_v	O_x	U_v	$U_{\%}$	V_v	V_x	A_v	A_x
	d	$\frac{gChZT}{m^3}$	$\frac{gChZT}{m^3}$	$\frac{kgsm}{m^3}$	$\frac{kgChZT}{m^3.d}$	$\frac{kgChZT}{kgsmd}$	$\frac{gChZT}{m^3}$	%	$\frac{gChZT}{m^3.d}$	$\frac{gChZT}{gsmd}$	$\frac{gTF}{m^3.h}$	$\frac{gTF}{kgsm.h}$
1	1	75,0	-	4,97	0,499	0,100	75	100	0,499	0,100	9,21	1,85
2	8	48,0	-	5,20	0,319	0,061	48	100	0,319	0,061	12,66	2,43
3	15	62,4	8,0	6,92	0,415	0,060	54,4	87,1	0,362	0,052	24,03	3,47
4	22	110,5	-	8,60	0,085	0,085	110,5	100	0,735	0,085	14,82	1,72
5	29	153,5	53,0	6,64	1,022	0,153	100,5	65,5	0,669	0,100	15,62	2,35
6	34	150,0	-	6,70	1,000	0,149	150	100	0,149	0,149	20,10	3,00
7	37	104,5	20,5	5,60	0,695	0,124	84	80,4	0,559	0,100	12,42	2,22
8	40	140	38,0	5,81	0,932	0,160	102	72,9	0,679	0,116	16,15	2,78
9	48	205,0	-	-	1,365	-	205	100	1,365	-	28,60	-
10	51	230,5	30,5	6,74	1,535	0,227	200	86,8	1,332	0,147	27,23	4,04
11	58	290,0	61,5	10,10	1,931	0,191	228,5	78,8	1,521	0,150	42,50	4,21
12	65	236,0	-	7,64	1,571	0,205	236	100	1,571	0,205	32,04	4,19
13	79	262,5	58,3	7,58	1,748	0,230	204,2	77,8	1,359	0,179	35,10	4,63
14	81	320,0	65,5	-	2,131	-	254,5	79,5	1,694	-	44,50	-
15	86	347,5	-	4,86	2,314	0,476	347,5	100	2,314	0,477	49,20	10,20

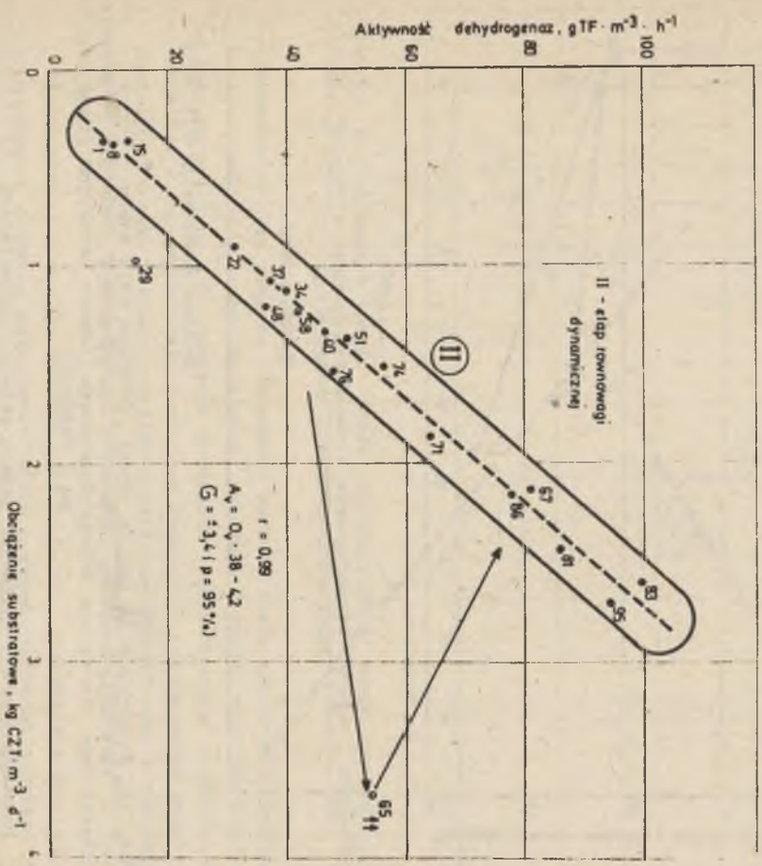
Tabela V

Charakterystyka procesu biodegradacji glukozy metodą osadu czynnego - oznaczenia w recyrkulacie oraz uzyskiwany stopień biologicznego oczyszczania

Lp.	Dzień doświadczeń	Recyrkulat			Odpływ				
		Współczynnik recyrkulacji	Stężenie substratu	Ilość osadu	Stężenie substratu	Usunięcie substratu			
			S_r	X_r	S_e	U_v	$U_{\%}$	V_v	V_x
	D	-	$\frac{g}{m^3}$	$\frac{kgsm}{m^3}$	$\frac{gChZT}{m^3}$	$\frac{gChZT}{m^3}$	%	$\frac{kgChZT}{m^3 \cdot d}$	$\frac{kgChZT}{kgsm \cdot d}$
1	1	6,95	29,0	6,42	19,0	57	76,0	0,379	0,076
2	8	3,52	-	8,09	19,5	28,5	59,3	0,189	0,036
3	15	3,52	4,3	7,90	15,5	46,9	75,1	0,312	0,045
4	22	2,52	-	13,92	5,0	105,5	95,4	0,702	0,081
5	29	2,52	48,0	7,90	43,0	110,5	71,9	0,735	0,110
6	34	2,52	-	-	40,0	110	73,3	0,732	0,109
7	37	2,52	66,0	7,26	30,0	74,5	71,2	0,496	0,088
8	40	2,52	-	-	35,0	104,5	74,6	0,695	0,119
9	48	2,52	-	-	35,0	170	82,9	1,132	-
10	51	2,52	38,5	12,80	38,5	192	83,3	1,278	0,189
11	58	2,52	-	-	50,5	239,5	82,5	1,595	0,157
12	65	2,52	137,0	11,20	46,0	190	80,5	1,265	0,165
13	79	2,52	-	-	42,5	220	83,9	1,465	0,193
14	81	2,52	-	-	58,5	261,5	81,1	1,741	-
15	86	2,52	-	-	46,0	301,5	86,7	2,007	0,413

ono średnio 77,2% (tabela III), natomiast dla modelu II średnio 81% (tabela V).

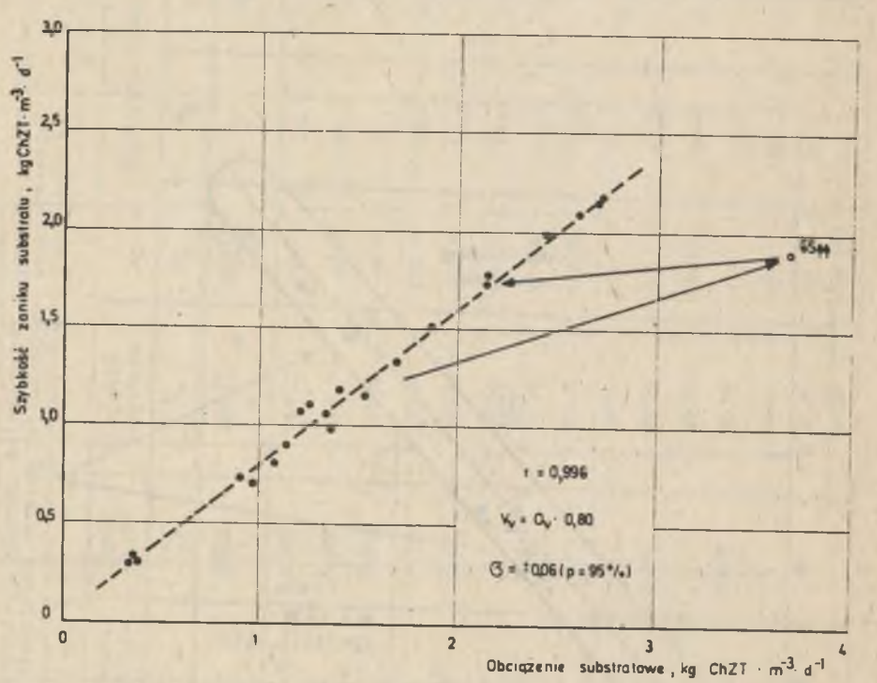
W przypadku biodegradacji fenolu nie obserwowano wstępnej fazy aklimatyzacji (rys. 11). Brak etapu aklimatyzacji wiązał się z tym, że drobnoustroje materiału zaszczepiającego ciągle stykały się z tym związkiem chemicznym. Pobierano je ze środowiska zawierającego znaczne ilości wód koksowniczych z dużą ilością związków fenolowych.



Rys. 11. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria II. Wykres fazowy aktywności dehydrogenaz i obciążenia substratowego

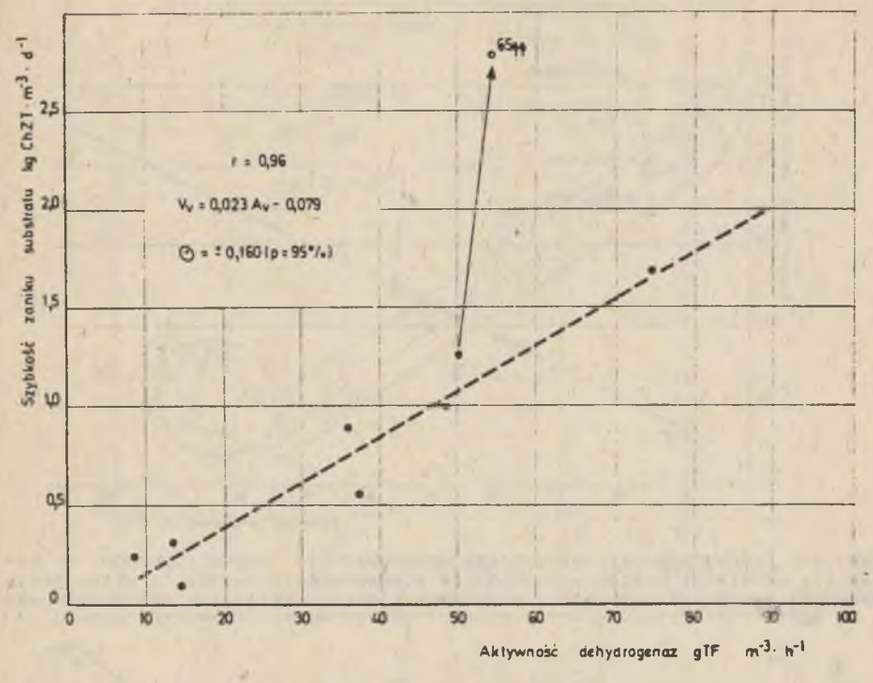
W całym okresie badań biodegradacji fenolu układ znajdował się w stanie równowagi dynamicznej (rys. 11). Jedynie 65 dnia doświadczeń nastąpił nagły wzrost obciążenia, co nie spowodowało jednak perturbacji w działalności modelu i po zmniejszeniu obciążenia do pierwotnej wielkości powrócił stan równowagi dynamicznej. Jednakże ten chwilowy wzrost obciążenia

substratowego był tak znaczny w porównaniu z wielkościami występującymi bezpośrednio wcześniej, iż przekroczyło to zdolności homeostatyczne całego układu (rys. 11). Także w tradycyjnym ujęciu zależności szybkości procesu biodegradacji od obciążenia substratowego punkt pomiarowy dla tego przypadku odbiegał od wykresu wyznaczonego przez wyniki uzyskane w stanie równowagi dynamicznej układu (rys. 12).



Rys. 12. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria II. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji fenolu i obciążeniem substratowym dla całego układu modelowego (komora aeracyjna osadu czynnego i osadnik)

Homeostatyczne właściwości całego układu, pozwalające na łagodzenie raptownych wahań obciążeń substratowych, wynikają ze wzajemnego uzupełnienia procesów biologicznych i fizykochemicznych. Świadczą o tym informacje przedstawiające zależność aktywności oddechowej drobnoustrojów i szybkości zaniku substratu wyliczone oddzielnie dla samego reaktora - komory napowietrzania osadu czynnego (rys. 13) oraz te same wielkości w odniesieniu do całego układu łącznie z osadnikiem wtórnym (rys. 14). Widać, iż w czasie nagłego przeciążenia substratowego wektor odchylenia wartości V_v od wartości średnich jest większy w tym pierwszym przypadku (rys. 13).

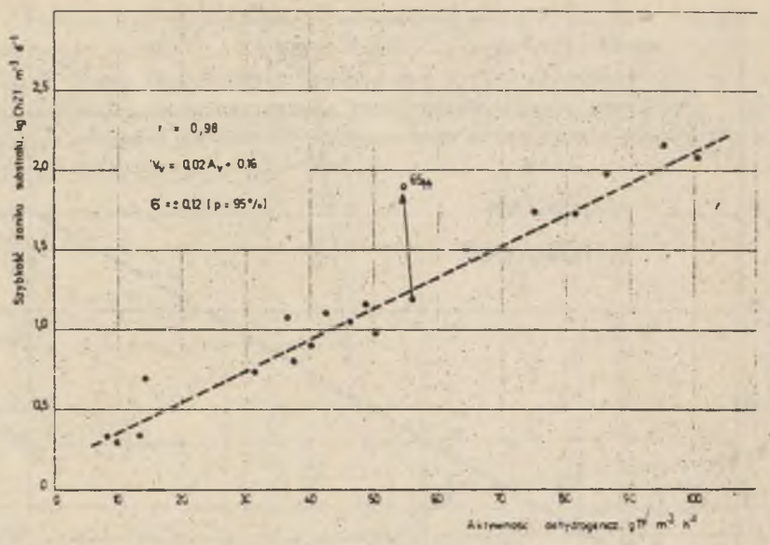


Rys. 13. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria II. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji fenolu i aktywnością dehydrogenaz w komorze aeracyjnej

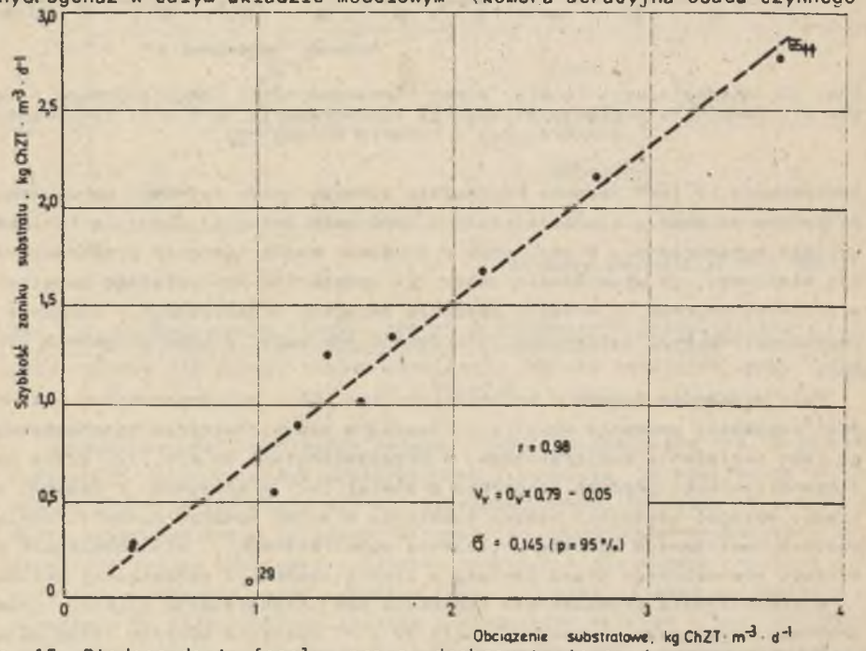
Spowodowane to jest zapewne zdolnością biomasy osadu czynnego do usuwania substratu za pomocą niebiologicznych procesów sorpcji. Jednakże zdolność ta jest ograniczona i w omawianym przypadku mogło nastąpić przekroczenie tej wielkości, co spowodowało desorpcję nadmiernie wchłoniętego substratu w osadniku wtórnym. W efekcie stężenie związków organicznych w odpływie z całego układu było wyższe niż oznaczane w odpływie z komory reakcji (tabela III).

Potwierdzeniem podanego wniosku jest rys. 15, przedstawiający zależność szybkości usuwania substratu (fenolu) w samym reaktorze biochemicznym od jego obciążenia substratowego. W przeciwieństwie do rys. 12, gdzie wyliczono szybkość procesu w oparciu o pomiar ChZT w odpływie z całego układu, wartość szybkości zaniku substratu w samej komorze napowietrzania, podczas gwałtownego wzrostu obciążenia substratowego, nie odbiegała od wykresu wyznaczonego przez pomiary w stanie równowagi dynamicznej układu.

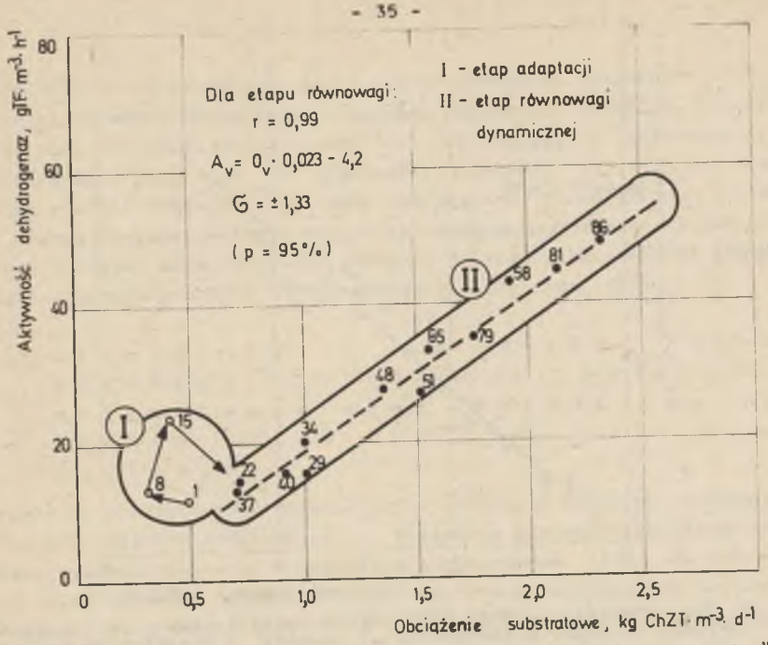
W równocześnie prowadzonych badaniach nad biodegradacją glukozy przez drobnoustroje osadu czynnego (tabela IV i V) wystąpił wyraźny etap aklimatyzacji tych drobnoustrojów (rys. 16). W materiale zaszczepiającym były one przystosowane do degradacji związków fenolowych. W pozostałym okresie



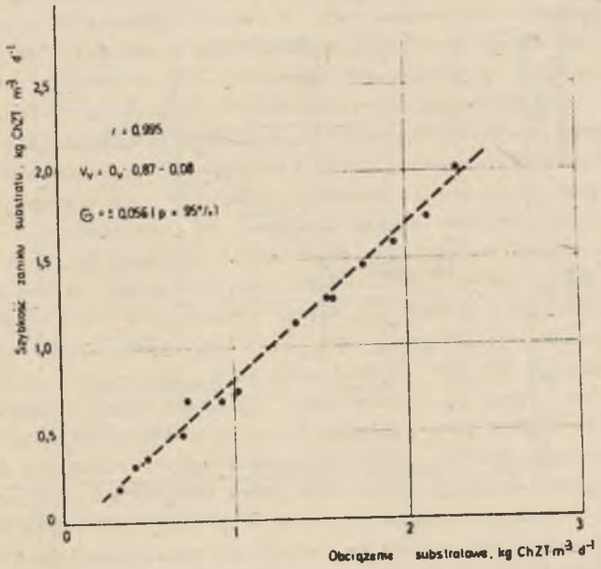
Rys. 14. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria II. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji fenolu i aktywnością dehydrogenaz w całym układzie modelowym (komora aeracyjna osadu czynnego



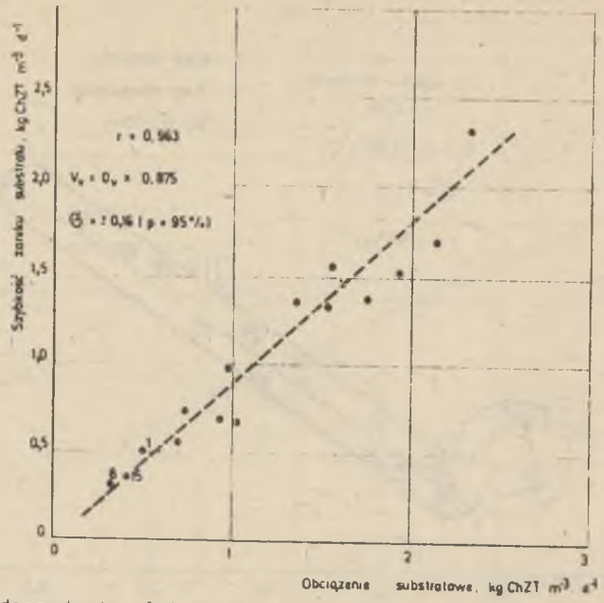
Rys. 15. Biodegradacja fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego - seria II. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji fenolu i obciążeniem substratowym w samej komorze aeracyjnej osadu czynnego



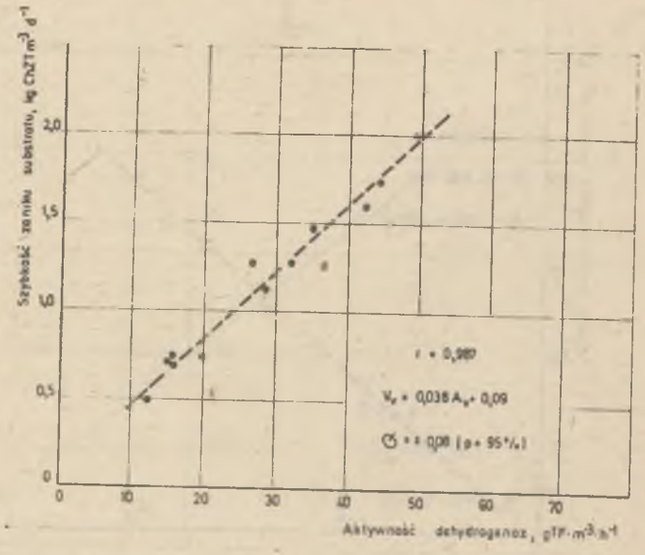
Rys. 16. Biodegradacja glukozy przez drobnoustroje osadu czynnego. Wykres fazowy aktywności dehydrogenaz i zmian obciążenia substratowego



Rys. 17. Biodegradacja glukozy przez drobnoustroje osadu czynnego. Korelacja pomiedzy szybkością biodegradacji glukozy i obciążeniem substratowym w całym układzie modelowym (komora aeracyjna osadu czynnego : osadnik



Rys. 18. Biodegradacja glukozy przez drobnoustroje osadu czynnego. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji glukozy i obciążeniem substratowym w komorze aeracyjnej



Rys. 19. Biodegradacja glukozy przez drobnoustroje osadu czynnego. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji glukozy i aktywnością dehydrogenaz w stanie równowagi dynamicznej

badań drobnoustroje znajdowały się w stanie równowagi dynamicznej. Nie notowano nagłych wzrostów obciążeń i wykresy zależności usuwania substratu w odniesieniu do całego układu (rys. 17), jak również w przeliczeniu na samą komorę aeracyjną (rys. 18) praktycznie pokrywały się. W tym drugim przypadku rozrzut wyników pomiarowych był większy, co potwierdza, iż własności homeostatyczne wykazuje cały układ modelowy. W stanie równowagi dynamicznej istniała duża korelacja pomiędzy oznaczaną aktywnością dehydrogenaz a szybkością procesów biodegradacji glukozy (rys. 19).

3.2.3. Biodegradacja składników wód odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego oraz bezwodnika ftalowego przez drobnoustroje osadu czynnego

Dotychczas przedstawione doświadczenia dotyczyły badań nad biodegradacją czystych związków chemicznych z dodatkiem pierwiastków biogennych w warunkach wyidealizowanych. Praktycznym sprawdzianem tezy, że kinetykę procesu osadu czynnego można opisać w oparciu o wyznaczanie aktywności dehydrogenaz, były wyniki uzyskane w badaniach biologicznego oczyszczania rzeczywistych wód odpadowych o bardziej złożonym składzie i zmiennych stężeniach.

Dalsze doświadczenia prowadzono z zastosowaniem wód odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego (model I) oraz bezwodnika ftalowego (model II). Wybór ten był związany z wykonywaniem obszernych badań nad wyznaczaniem optymalnych parametrów biologicznego oczyszczania tych wód odpadowych metodą osadu czynnego [45]. Pozwalało to na wszechstronną charakterystykę procesu i powiązanie podstawowych jego parametrów z oznaczaną aktywnością dehydrogenaz. Z zestawienia tych parametrów technologicznych procesu wynika (tabela VI i VII), że stosowaną metodę biologicznego oczyszczania można było zaliczyć do wysokosprawnych sposobów osadu czynnego [14]. Decydowało o tym znaczne obciążenie substratowe oraz uzyskiwany stopień oczyszczania. Obciążenie wynosiło średnio 4,9 kg ChZT/m^3.d w przypadku "maleinowych" wód odpadowych (model I) oraz 5,3 kg ChZT/m^3.d dla "ftalowych" wód odpadowych (model II). Dla pomiarów BZT_5 notowano odpowiednio wielkości 1,91 kg BZT_5/m^3.d oraz 1,85 kg BZT_5/m^3.d. Uwzględniając zawartą w komorach napowietrzania ilość mikroorganizmów określono obciążenie średnie 2,31 kg ChZT/kg sm.d w modelu I oraz 1,78 kg ChZT/kg sm.d w modelu II, a wielkości obciążeń wyrażone w BZT_5 dawały odpowiednio wartości 1,91 oraz 0,62 kg BZT_5/kg sm.d. Dla takich średnich obciążeń uzyskiwano wysoki stopień oczyszczania w I i II modelu wynoszący średnio 70 i 73% usunięcia zanieczyszczeń wyrażonych za pomocą ChZT. Procent usunięcia tych zanieczyszczeń wyrażonych przez wartości BZT_5 był wyższy i wynosił średnio 92 i 84%.

Tabela V

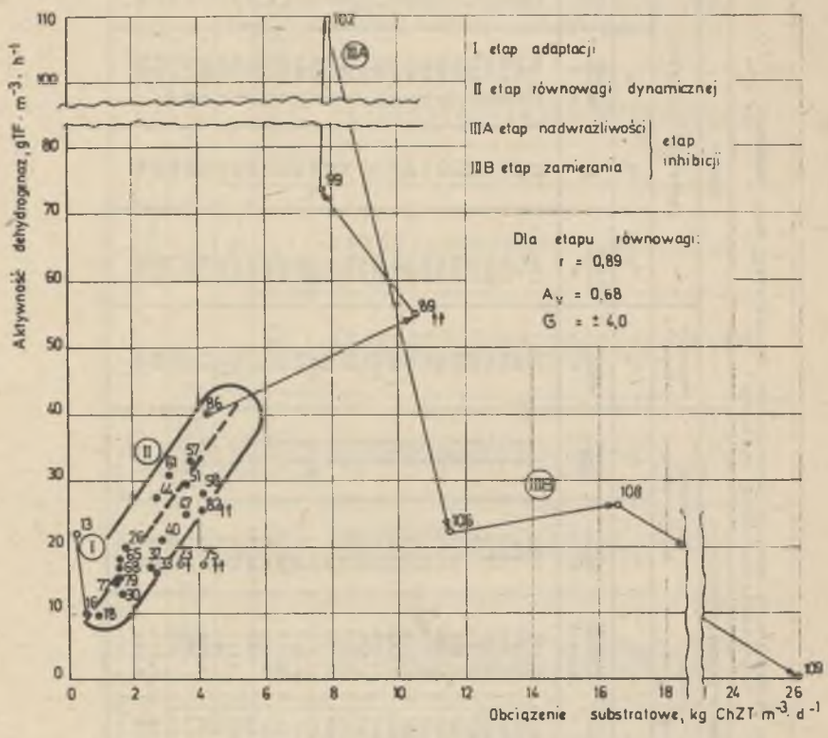
Charakterystyka procesu biodegradacji związków organicznych obciążających wody odpadowe z produkcji bezwodnika maleinowego

Lp.	Dzień dośw.	Dopływ	Komora napowietrzania					Odpływ				
		Stężenie substratu	Ilość osadu	Obciążenie substratowe		Aktywność dehydrogenaz		Stężenie substratu	Usunięcie substratu			
		S_o	X	O_v	O_x	A_v	A_x	S_e	U_v	$U_{\%}$	V_v	V_x
	d	gChZT/m³	kgsm/m³	kgChZT/m³.d	kgChZT/kgsm.d	gTF/m³.h	gTF/gsm.h	gChZT/m³	gChZT/m³	%	kgChZT/m³.d	kgChZT/kgsm.d
1	13	185	2,57	0,185	0,072	21,8	8,5	40	145	78	0,145	0,056
2	16	250	1,10	0,500	0,454	10,0	9,1	55	195	78	0,390	0,355
3	18	385	1,50	0,770	0,513	9,8	6,5	60	325	84	0,650	0,433
4	23	825	2,70	3,300	1,222	17,4	6,4	120	705	85	2,820	1,044
5	26	440	2,00	1,760	0,880	20,1	10,0	80	360	82	1,440	0,720
6	30	200	1,08	1,600	1,481	12,1	11,2	35	165	82	1,320	1,222
7	33	320	1,50	2,560	1,707	16,2	10,8	110	210	66	1,680	1,120
8	37	305	1,08	2,440	2,259	17,6	16,3	65	240	79	1,920	1,778
9	40	350	1,05	2,800	2,667	21,0	20,0	77	273	78	2,184	1,080
10	44	320	1,65	2,560	1,551	27,3	16,5	80	240	75	1,920	1,164
11	47	445	1,80	3,560	1,978	25,2	14,0	170	275	62	2,200	1,222
12	51	445	1,26	3,560	2,825	29,7	23,6	90	355	80	2,840	2,254
13	54	445	0,78	3,640	4,667	33,6	43,1	97	358	80	2,864	3,672
14	58	499	0,64	3,992	6,238	28,2	44,1	121	378	76	3,024	4,725
15	61	377	0,60	3,016	6,027	30,8	58,0	87	290	77	2,320	3,867
16	65	186	0,65	1,488	2,289	18,1	27,8	39	147	79	1,176	1,809
17	68	186	0,73	1,488	2,038	17,2	23,6	50	136	73	1,088	1,490
18	72	208	1,84	1,664	0,904	15,0	8,1	37	171	82	1,368	0,743
19	75	511	1,92	4,088	2,129	33,6	17,5	74	437	85	3,496	1,821
20	79	188	2,14	1,504	0,703	15,0	7,0	45	143	76	1,444	0,535
21	82	510	2,71	4,080	1,506	25,6	9,4	60	450	88	3,600	1,328
22	86	510	4,59	4,080	0,889	40,0	8,7	89	421	82	3,368	0,734
23	89	1299	5,16	5,296	1,007	54,8	4,8	179	1,120	86	4,480	0,868
24	99	640	5,33	7,680	1,441	71,4	13,4	202	438	68	5,256	0,986
25	102	605	6,40	7,800	0,756	109,6	17,2	98	507	84	6,084	0,951
26	106	475	5,84	11,400	2,117	22,0	3,8	380	96	20	2,304	0,428
27	108	689	3,67	16,536	4,512	26,8	7,3	605	84	12	2,016	0,550
28	109	541	2,40	25,968	10,320	0,0	0,0	517	24	4	1,152	0,480

Tabela VII

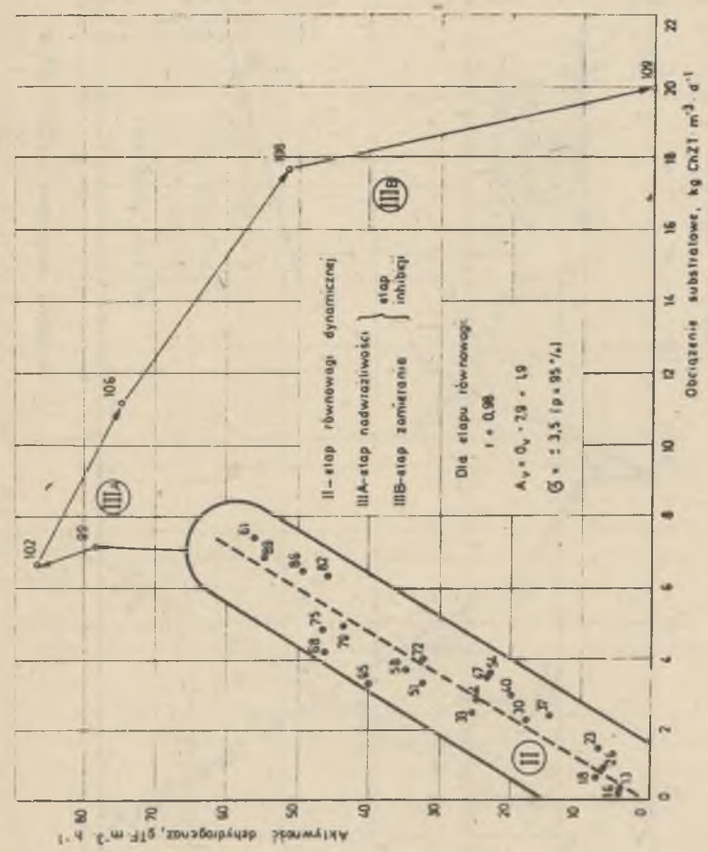
Charakterystyka procesu biodegradacji związków organicznych obciążających wody odpadowe z produkcji bezwodnika ftalowego

Lp.	Dzień dośw.	Dopływ	Komora napowietrzania					Odpływ				
		Stężenie substratu	Ilość osadu	Obciążenie substratowe		Aktywność dehydrogenaz		Stężenie substratu	Usunięcie substratu			
		S_o	X	O_v	O_x	A_v	A_x	S_e	U_v	$U_{\%}$	V_v	V_x
	d	gChZT/m³	kgsm/m³	kgChZT/m³.d	kgChZT/kgsm.d	gTF/m³.h	gTF/gsm.h	gChZT/m³	gChZT/m³	%	kgChZT/m³.d	kgChZT/kgsm.d
1	13	275	1,37	0,275	0,201	4,2	3,1	77	198	72	0,198	0,145
2	16	95	1,2	0,190	0,158	4,6	3,8	35	60	63	0,120	0,100
3	18	290	1,9	0,580	0,305	8,0	4,2	20	270	93	0,540	0,284
4	23	370	4,6	1,480	0,322	7,6	1,7	75	295	80	1,180	0,257
5	26	205	3,0	0,820	0,273	6,8	2,3	75	130	63	0,520	0,173
6	30	290	3,32	2,320	0,699	18,1	5,4	60	320	110	1,840	0,554
7	33	305	2,42	2,440	1,008	19,57	10,7	60	245	80	1,960	0,810
8	37	300	2,56	2,400	0,938	14,3	5,6	70	230	77	1,840	0,719
9	40	370	3,63	2,960	0,815	20,4	5,6	150	220	59	1,760	0,485
10	44	355	4,43	2,840	0,641	24,4	5,5	60	295	83	2,360	0,533
11	47	430	2,36	3,440	1,458	23,1	9,8	145	285	66	2,280	0,966
12	51	410	2,16	3,280	1,519	32,6	15,1	115	295	72	2,360	1,093
13	54	450	3,44	3,600	1,047	23,7	6,9	73	377	84	3,016	0,877
14	58	460	4,66	3,680	0,790	35,1	7,5	68	392	85	3,136	0,673
15	61	922	3,88	7,376	1,901	56,1	14,5	106	816	88	6,528	1,682
16	65	480	4,69	3,340	0,819	40,0	8,5	82	398	83	3,184	0,779
17	68	528	4,73	4,224	0,893	46,3	9,8	67	461	87	3,688	0,780
18	72	496	4,65	3,968	0,853	32,5	7,0	30	466	94	3,728	0,802
19	75	1190	4,40	4,796	1,082	46,5	10,6	69	1121	94	4,484	0,019
20	79	610	4,36	4,880	1,119	43,6	10,0	109	501	82	4,008	0,919
21	82	784	4,47	6,272	1,262	45,4	9,1	322	462	59	3,696	0,744
22	86	797	7,12	6,376	0,896	49,2	6,9	87	710	89	5,680	0,798
23	89	853	5,27	6,824	1,295	55,1	10,5	129	724	85	5,792	1,099
24	99	600	3,65	7,200	1,975	78,6	13,4	69	531	88	6,373	1,746
25	102	546	4,11	6,552	1,594	86,4	17,1	74	472	86	5,664	1,378
26	106	467	2,70	11,208	4,344	75,2	27,9	384	83	18	1,992	9,772

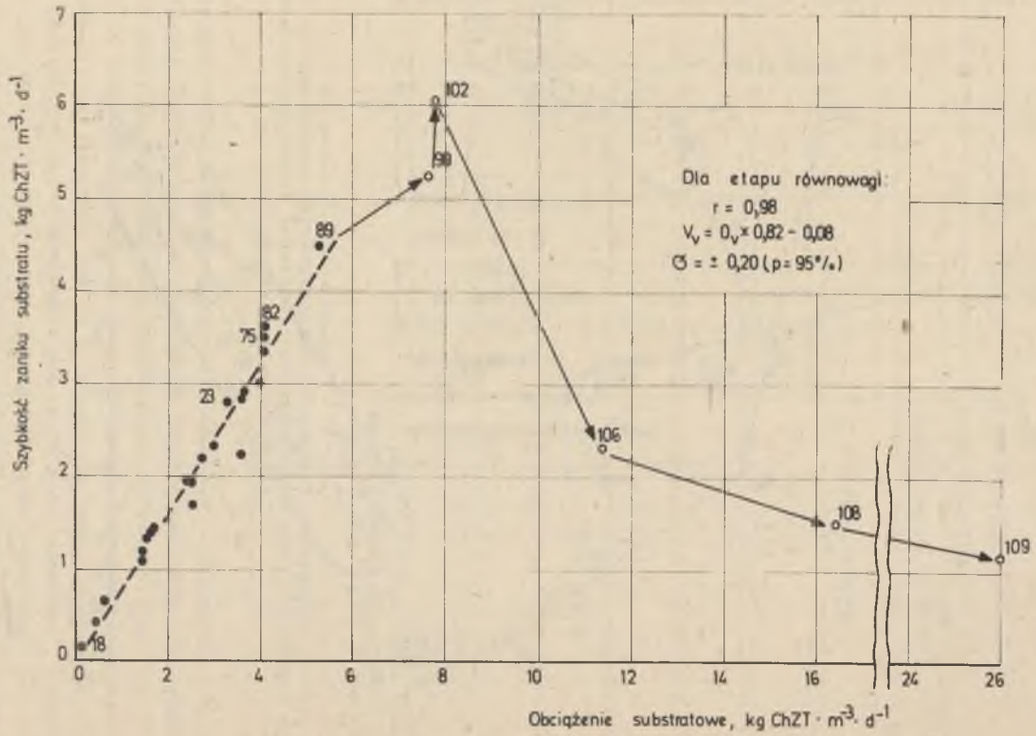


Rys. 20. Wykres fazowy aktywności dehydrogenaz i obciążenia substratowego w procesie biodegradacji substancji obciążających wody odpadowe z produkcji bezwodnika maleinowego

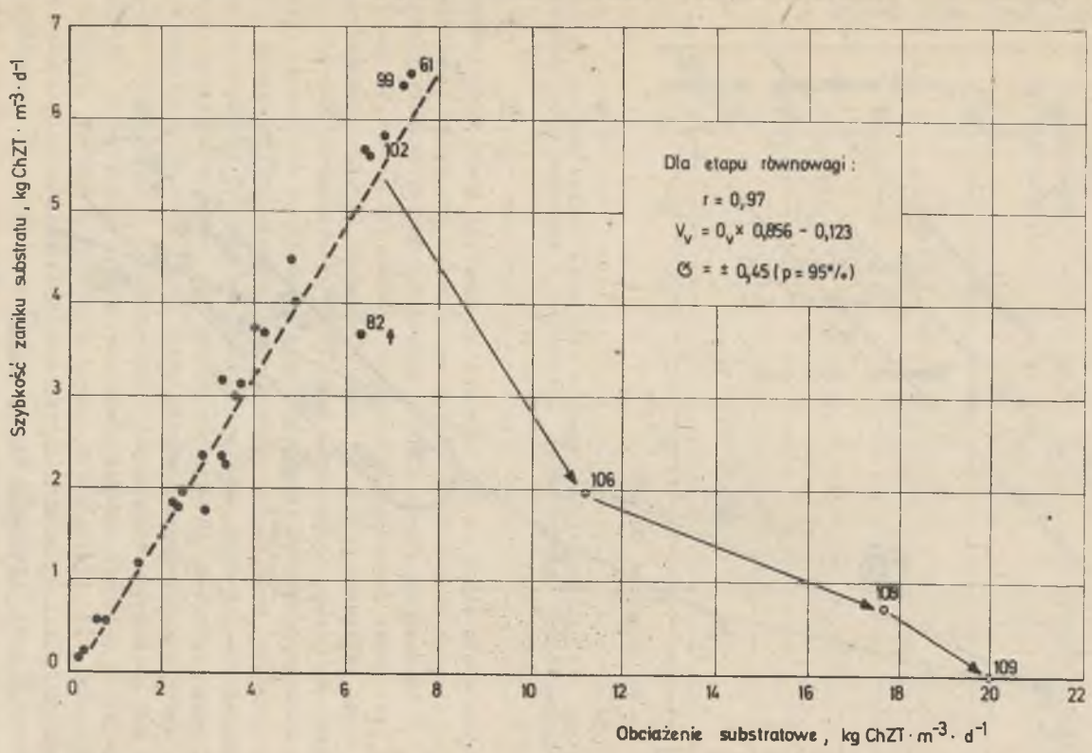
Prowadzenie badań w znacznym zakresie obciążeń substratowych potwierdziło wnioski dotyczące zmian aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów wysunięte w oparciu o doświadczenia poprzednie. Opracowany dla tych doświadczeń wykres fazowy wskazywał, że etap adaptacji drobnoustrojów w modelu I (bezwodnik ftalowy) kończył się po 2 tygodniach (rys. 20 tabela VI). Od 16 dnia doświadczeń układ znajdował się w stanie równowagi dynamicznej (rys. 20). W modelu II (bezwodnik maleinowy) okres adaptacji był krótszy i zakończył się do 13 dnia doświadczeń (rys. 21, tabela VII). Rysunki 20 i 21 dowodzą także, iż zakres stosowanych obciążeń w końcowych dniach doświadczeń powodował wystąpienie etapu inhibicji i poprzedzający go stan nadwrażliwości komórek drobnoustrojów, w którym mikroorganizmy wykazywały większą aktywność, niż wynikało to z obciążenia substratowego. Rysunek 20 ujawnia, iż na podwyższenie obciążenia substratowego 89 dnia doświadczeń



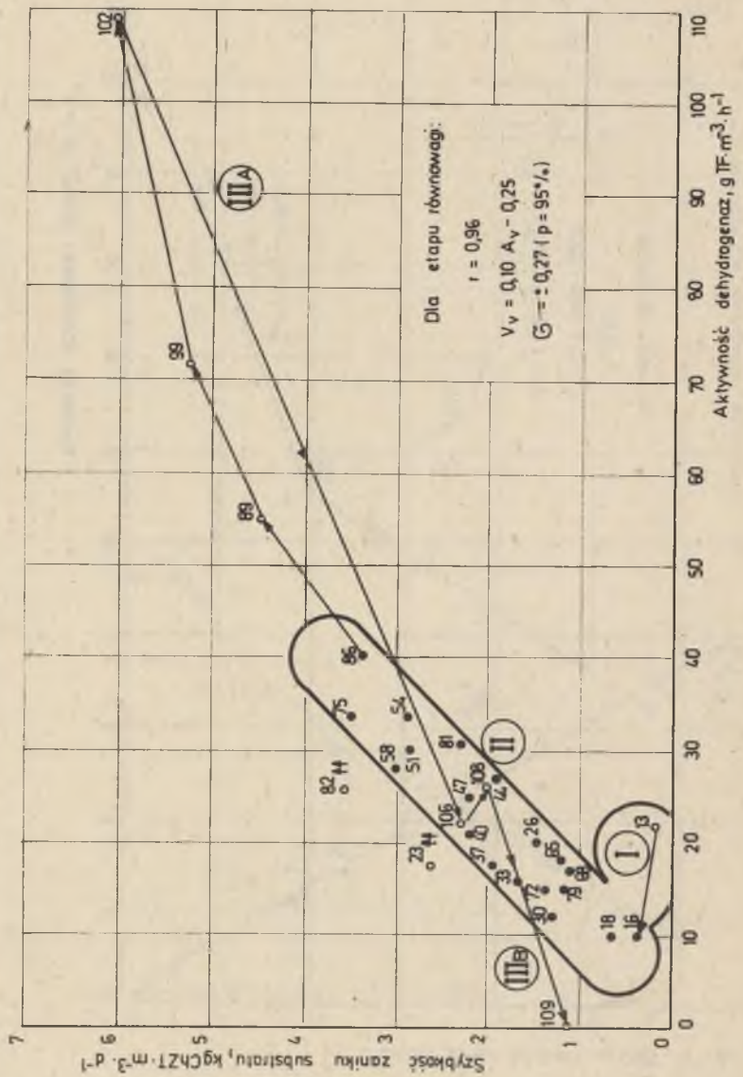
Rys. 21. Wykres fazowy aktywności dehydrogenaz i obciążenia substratowego w procesie biodegradacji substancji obciążających wody odpadowe z produkcji bezwodnika ftalowego



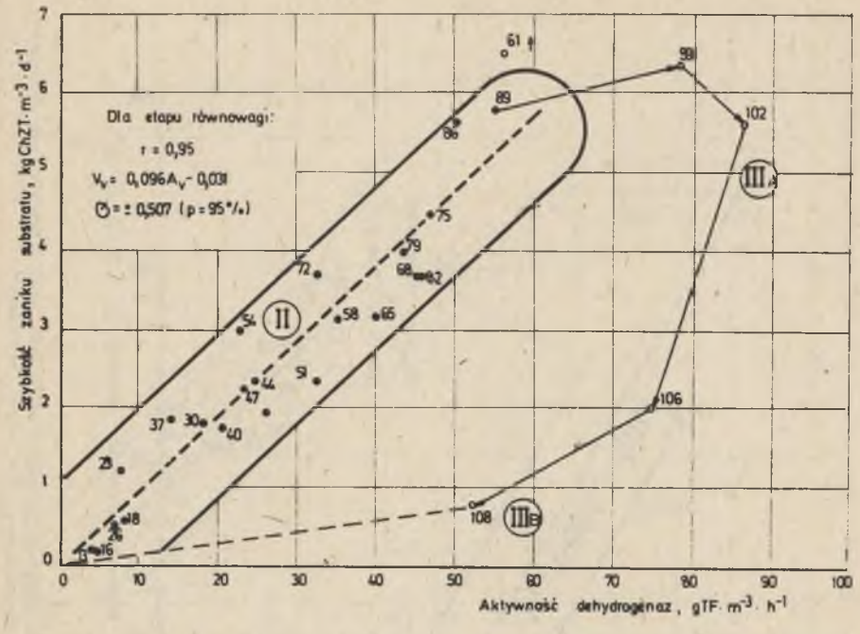
Rys. 22. Zmiany szybkości biodegradacji substancji obciążających "maleinowe" wody odpadowe i obciążenia substratowego



Rys. 23. Zmiany szybkości biodegradacji substancji obciążających "ftalowe" wody odpadowe i obciążenia substratowego



Rys. 24. Wykres fazowy szybkości biodegradacji substancji obciążających "maleinowe" wody odpadowe i aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego

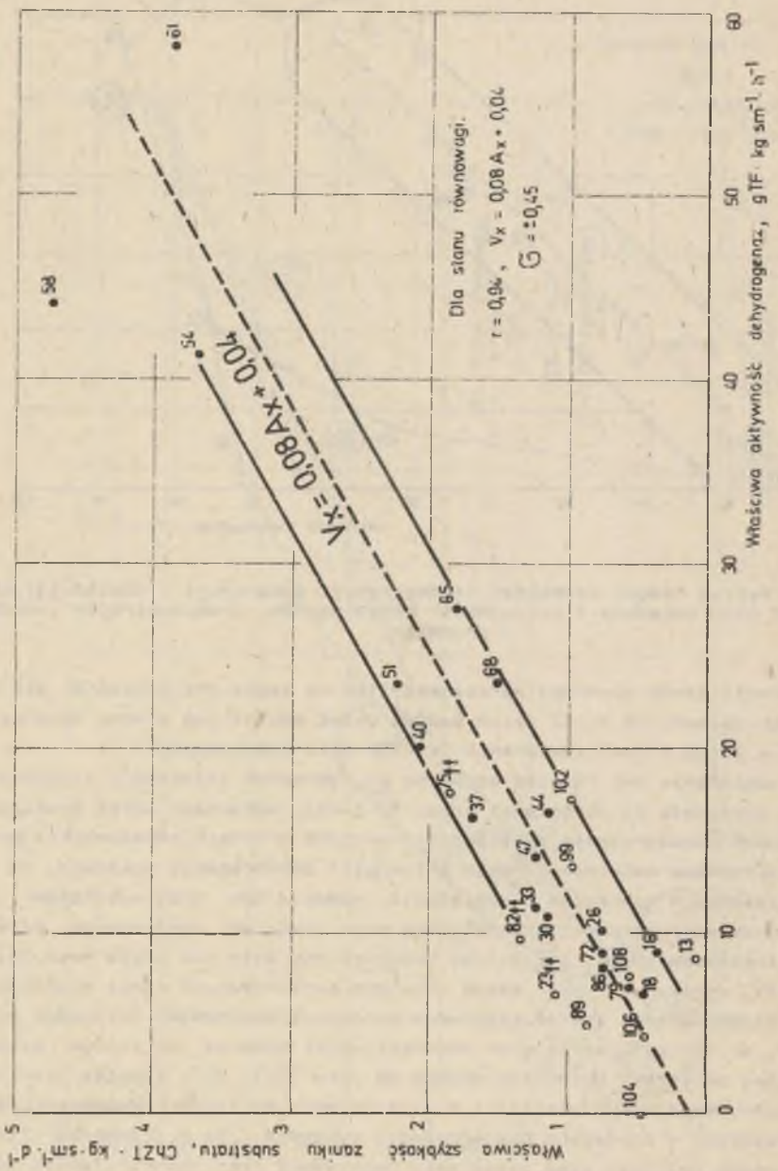


Rys. 25. Wykres fazowy szybkości biodegradacji substancji obciążających "ftalowe" wody odpadowe i aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego

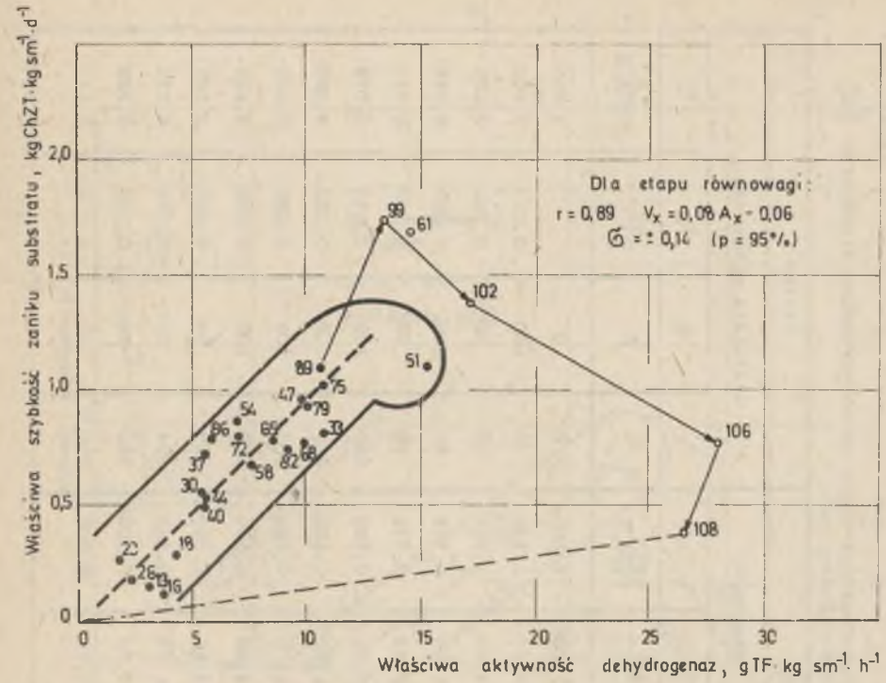
drobnoustroje osadu czynnego zareagowały jak na nagłe przeciążenie, ale w następnych dniach (99 i 102 dzień badań) układ wszedł już w etap nadwrażliwości, a potem w etap zamierania (od 106 dnia doświadczeń).

Etap zamierania był również widoczny na wykresach zależności szybkości usuwania substratu od obciążenia (rys. 22 i 23). Natomiast obraz graficzny szybkości biodegradacji substancji zawartych w wodach odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego oraz aktywności dehydrogenaz wskazuje, że w kilku przypadkach nastąpiło przeciążenie substratowe drobnoustrojów i wówczas punkty pomiarowe znajdowały się poza obszarem wyznaczanym przez wyniki uzyskiwane wtedy, gdy zmiany obciążeń nie były tak nagłe (rys.24).

Z kolei, uzyskany w takim samym układzie współrzędnych obraz graficzny procesu biodegradacji zanieczyszczeń z produkcji bezwodnika ftalowego potwierdza, iż wystąpił tutaj stan nadwrażliwości komórek, po którym szybkość zaniku substratu zmierzała szybko do zera (rys. 25). Również ilustracje ujmujące wymienione wielkości w przeliczeniu na ilość drobnoustrojów uczestniczących w procesach biodegradacji wykazują, że w przypadku "ftalowego" osadu czynnego etap zamierania poprzedzał stan nadwrażliwości komórek drobnoustrojów (rys. 26). Dla "maleinowego" osadu czynnego stan ten nie ujawnił się (rys. 27).



Rys. 26. Wykres fazowy właściwej szybkości biodegradacji substancji obciążających "maleinowe" wody odpadowe i aktywności właściwej dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego



Rys. 27. Wykres fazowy właściwej szybkości biodegradacji substancji obciążających "ftalowe" wody odpadowe i aktywności właściwej dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego

3.2.4. Ocena kinetyki procesu osadu czynnego w oparciu o pomiar aktywności dehydrogenaz

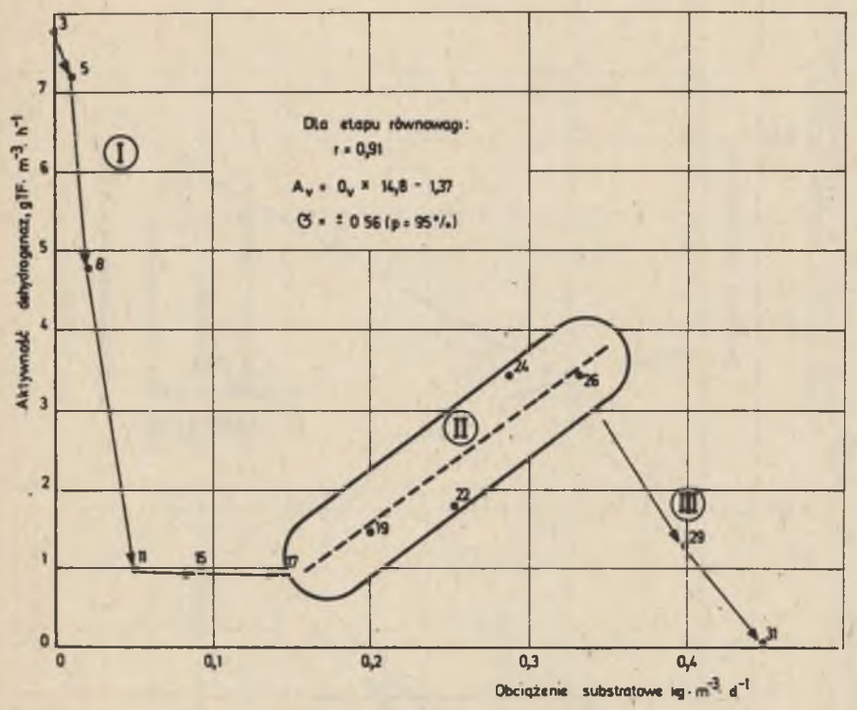
Dalszym sprawdzianem słuszności tezy, że kinetykę procesów biodegradacyjnych prowadzonych przez drobnoustroje osadu czynnego można opisać w oparciu o pomiary aktywności dehydrogenaz, było wykorzystanie informacji dotyczących biodegradacji fenolu pochodzących z prac obcych. Dogodne do tego okazały się wyniki doświadczeń uzyskane przez Stachowicz [62] wykonane w innym celu. Materiały doświadczalne tej pracy zawierały szczegółowe informacje dotyczące charakterystyki procesu biodegradacji fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego i aktywności dehydrogenaz tych drobnoustrojów. Informacje te umożliwiły zestawienie tabeli VIII. Na tej podstawie opracowano wykresy fazowe zależności aktywności dehydrogenaz od obciążenia substratowego (rys. 28) oraz korelacji szybkości degradacji fenolu i aktywności dehydrogenaz w stanie równowagi dynamicznej (rys. 29).

Sporządzony wykres fazowy ujawnił w badaniach Stachowicz [62] nad biodegradacją fenolu występowanie etapu adaptacji drobnoustrojów osadu czynnego do 17 dnia doświadczeń (rys. 28, tabela VIII). Od 19 do 26 dnia tych

Tabela VIII

Charakterystyka procesu biodegradacji fenolu przez drobnoustroje osadu czynnego według Stachowicz [62] oraz dodatkowych informacji tego autora

Lp.	Dzień dośw.	Dopływ	Komora napowietrzenie						Odpływ		
					Obciążenie substratowe		Aktywność		Usunięcie substratu		
	d	Ilość fenolu S_o $\frac{g}{m^3}$	Ilość osadu X $\frac{kgsm}{m^3}$	O_v $\frac{kg}{m^3 \cdot d}$	O_x $\frac{kg}{kgsm \cdot d}$	A_v $\frac{gTF}{m^3 \cdot d}$	A_x $\frac{gTF}{kgsm \cdot h}$	U_v $\frac{g}{m^3}$	$U_{\%}$ %	V_v $\frac{kg}{m^3 \cdot d}$	V_v $\frac{kg}{kgsm \cdot d}$
1	3	0	4,812	0	0,000	7,70	1,600	0	0		0,000
2	5	10	4,698	0,010	0,002	7,20	1,532	10	100	0,010	0,002
3	8	20	3,755	0,019	0,005	4,80	1,276	18	90	0,018	0,005
4	11	50	2,797	0,050	0,018	1 00	0,356	50	100	0,050	0,018
5	15	100	2,760	0,092	0,033	0,93	0,336	98	98	0,090	0,032
6	17	150	1,845	0,144	0,078	0,92	0,500	150	100	0,144	0,078
7	19	200	2,225	0,200	0,090	1,46	0,656	200	100	0,200	0,090
8	22	250	2,306	0,255	0,110	1,76	0,764	250	100	0,255	0,110
9	24	300	2,259	0,276	0,122	3,48	1,540	300	100	0,276	0,122
10	26	350	2,466	0,336	0,136	3,44	1,396	329	94	0,316	0,128
11	29	400	2,286	0,400	0,175	1,25	0,548	394	98	0,394	0,172
12	31	450	1,525	0,450	0,295	0,00	0,000	350	78	0,350	0,229
13	34	500	1,737	0,510	0,294	0,00	0,000	250	50	0,255	0,147

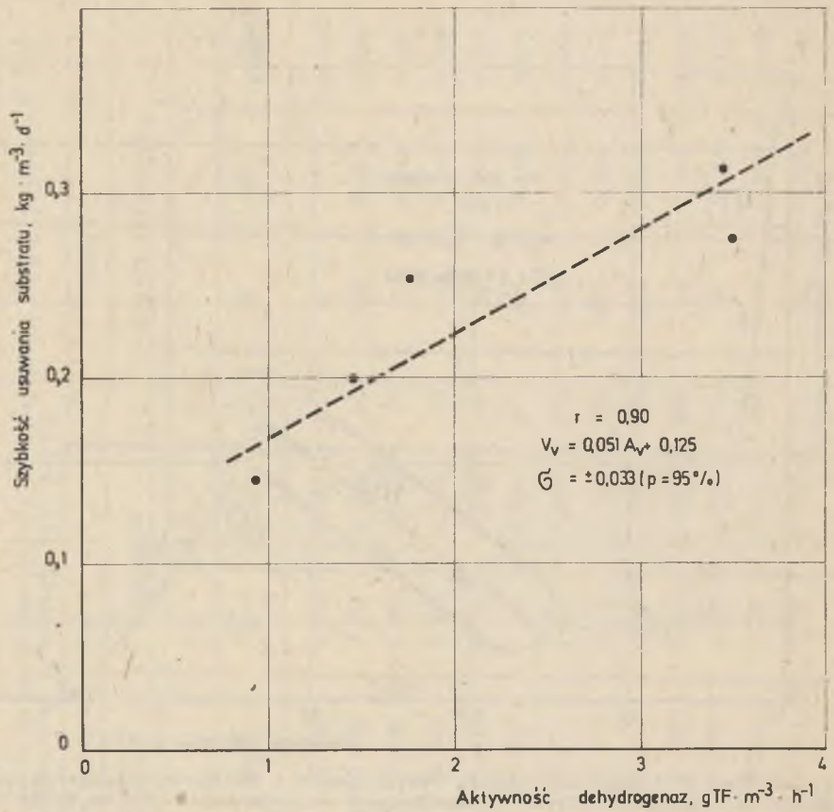


Rys. 28. Wykres fazowy aktywności dehydrogenaz i obciążenia substratowego w procesie biodegradacji fenolu opracowany na podstawie wyników badań Stachowicz [62]

badań przy stopniowym wzroście obciążenia substratowego wyodrębnił się etap równowagi dynamicznej. Dalszy wzrost obciążenia powodował już zaburzenie homeostazy i następował etap zamierania drobnoustrojów. W okresie równowagi dynamicznej wyliczony współczynnik korelacji pomiędzy obciążeniem substratowym i aktywnością dehydrogenaz był wprawdzie niższy niż osiągany w własnych doświadczeniach, jednak także wysoki (rys. 28). W etapie równowagi dynamicznej istniała także wprost proporcjonalna zależność pomiędzy aktywnością dehydrogenaz a szybkością usunięcia substratu (rys. 29).

W dostępnej literaturze nie znaleziono innych wyników, które pozwalałyby na sporządzenie na ich podstawie wykresów fazowych i ustalenie równań kinetyki w oparciu o pomiar aktywności dehydrogenaz.

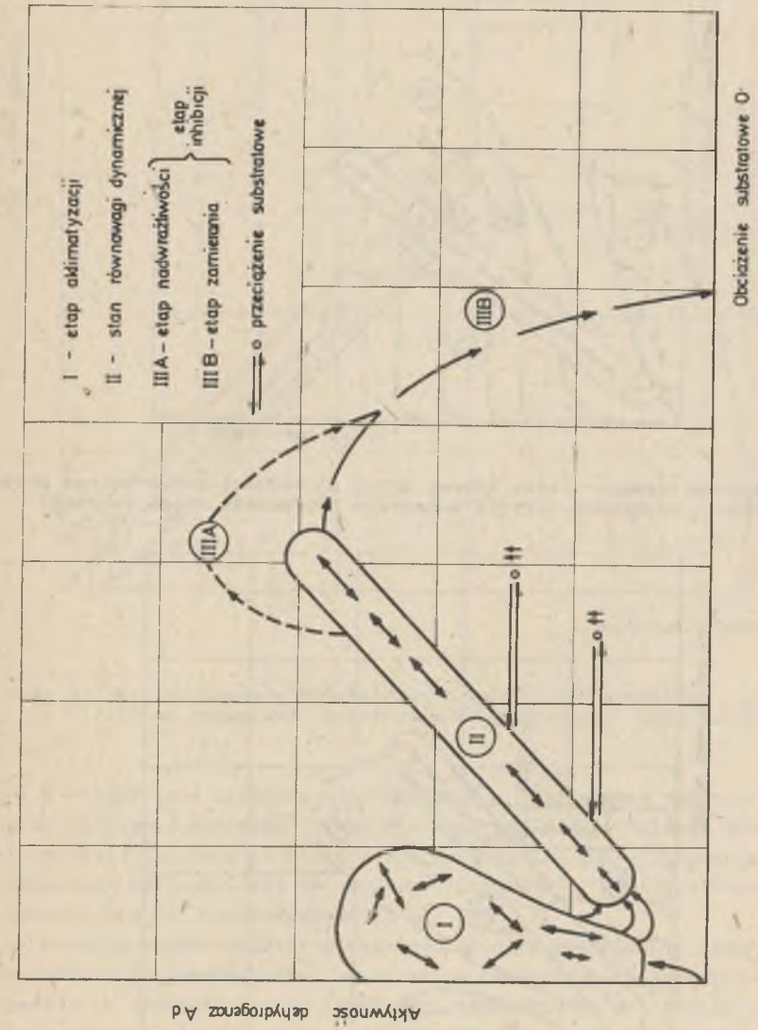
Interesujące było podjęcie próby uogólnienia rezultatów badań nad współzależnością pomiędzy aktywnością dehydrogenaz drobnoustrojów i podstawowymi parametrami procesu osadu czynnego - obciążeniem substratowym



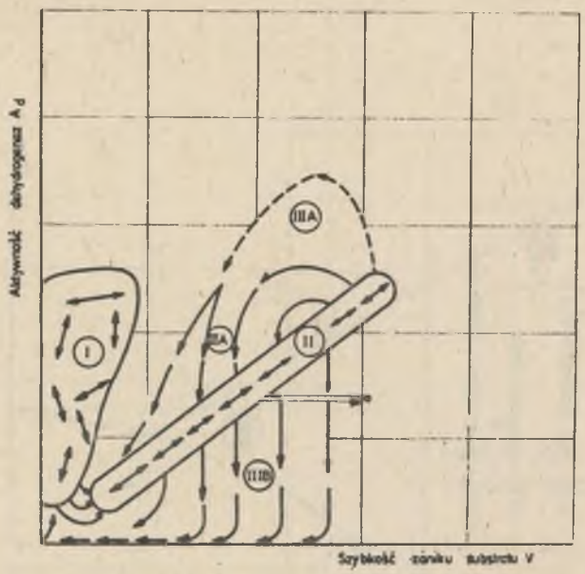
Rys. 29. Korelacja pomiędzy szybkością biodegradacji fenolu i aktywnością dehydrogenaz w stanie równowagi dynamicznej opracowana na podstawie wyników badań Stachowicz [62]

oraz szybkością usunięcia substratu. Rysunek 30 ukazuje w sposób wyidealizowany wyodrębnione poszczególne etapy procesu osadu czynnego ujawniające się na wykresie fazowym w układzie osi współrzędnych: "obciążenie substratowe" i "aktywność dehydrogenaz". Natomiast te same etapy procesu przedstawione w osiach współrzędnych "aktywność dehydrogenaz" i "szybkość zużycia substratu" ujmują rys. 31 i 32.

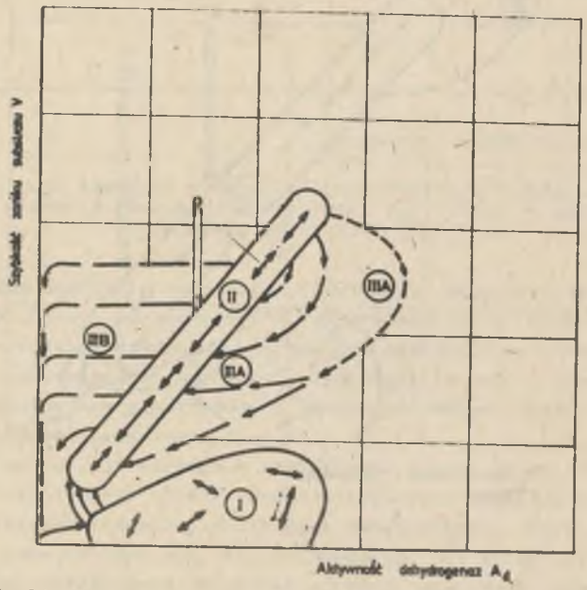
Układ osi na rys. 31 pozwala w zestawieniu z rys. 30 na porównanie różnic wielkości obciążenia substratowego i szybkości usuwania substratu przy tej samej wartości oznaczanej aktywności dehydrogenaz. Natomiast rys. 32 stanowi lustrzane odbicie rys. 31, co powoduje, iż wyniki ujęte są zgodnie z logiczną zależnością, w której szybkość usunięcia substratu jest funkcją aktywności fizjologicznej drobnoustrojów osadu czynnego.



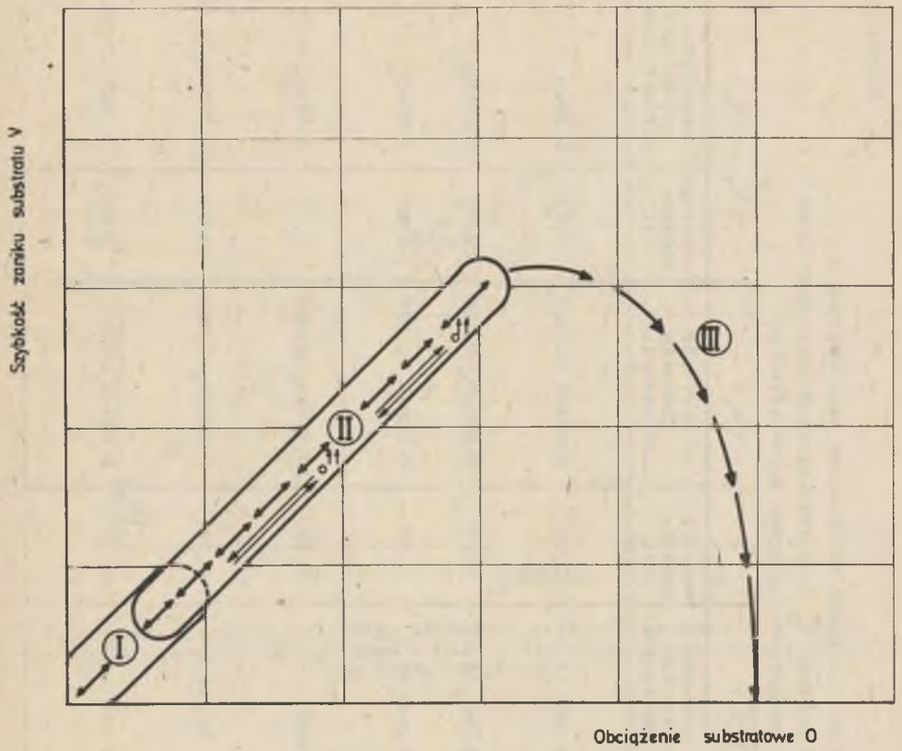
Rys. 30. Wyidealizowany wykres fazowy zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów i obciążenia substratowego w procesie osadu czynnego



Rys. 31. Wyidealizowany wykres fazowy zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów i szybkości zużycia substratu w procesie osadu czynnego



Rys. 32. Wyidealizowany wykres fazowy zmian szybkości zużycia substratu i aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego (odwrócone osie układu współrzędnych)



Rys. 33. Wyidealizowany wykres fazowy zależności szybkości usuwania substratu od obciążenia substratowego w procesie osadu czynnego

W tradycyjnym układzie współrzędnych - "obciążenie substratowe" i "szybkość usunięcia substratu", nie ujawniał się etap adaptacji drobnoustrojów (rys. 33). Wartości obciążeń substratowych i szybkości procesu dla etapu adaptacji nakładały się na rezultaty uzyskiwane w etapie równowagi dynamicznej procesu degradacyjnego.

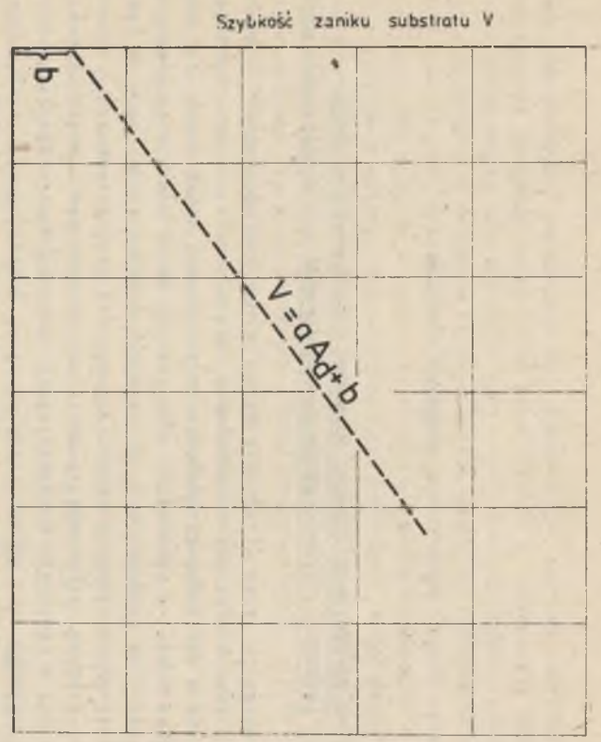
Wyodrębnienie rezultatów doświadczeń otrzymywanych w etapie równowagi dynamicznej i naniesienie ich na układ współrzędnych "aktywność dehydrogenaz" i "szybkość zaniku substratu" pozwalają na wyliczenie współczynnika korelacji pomiędzy tymi wielkościami oraz ustalenie równania matematycznego dla bioinżynieryjnego procesu osadu czynnego (rys. 34).

Dla przedstawionych badań występujące zależności pomiędzy obciążeniem substratowym, aktywnością dehydrogenaz drobnoustrojów oraz szybkością zużywania substratu ukazuje tabela IX.

Tabela IX

Zbiorcze zestawienie zależności pomiędzy obciążeniem substratowym O_v, aktywnością dehydrogenaz mikroorganizmów A_v oraz szybkością zużycia substratu V_v w etapie równowagi dynamicznej procesu osadu czynnego

Doświadczenie	$A_v = f(O_v)$		$V_v = f(A_v)$		$V_v = f(O_v)$	
	współcz. korelacji	uzyskane równania matematyczne	współcz. korelacji	uzyskane równania matematyczne	współcz. korelacji	uzyskane równania matematyczne
Biodegradacja fenolu (seria I)	0,95	$14,8xO_v-2,0$	0,97	$0,052xA_v+0,029$	0,93	$0,78xO_v$
Biodegradacja fenolu (seria II)	0,99	$38,0xO_v-4,2$	0,98	$0,020xA_v+0,160$	0,99	$0,80xO_v$
Biodegradacja glukozy	0,99	$22,9xO_v-4,2$	0,99	$0,038xA_v+0,090$	0,99	$0,87xO_v$
Biodegradacja składników wód odpadowych z prod. bezwodnika maleinowego	0,89	$6,8xO_v$	0,96	$0,100xA_v-0,250$	0,98	$0,82xO_v-0,08$
Biodegradacja składników wód odpadowych z produkcji bezwodnika ftalowego	0,98	$7,9xO_v+1,9$	0,35	$0,096xA_v-0,031$	0,97	$0,086xO_v-0,12$
Biodegradacja fenolu w badaniach Stachowicz [62]	0,91	$14,8xO_v-1,4$	0,90	$0,051xA_v+0,125$	0,90	$0,70xO_v-0,04$



Rys. 34. Wyidealizowana zależność szybkości rozkładu substratu od aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów w stanie równowagi dynamicznej w procesie osadu czynnego

4. DYSKUSJA WYNIKÓW

4.1. Wykorzystanie wykresu fazowego w interpretacji zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów w procesie osadu czynnego

Wyznaczanie zmian aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów może być pomocne w charakterystyce bioinżynieryjnego procesu osadu czynnego oraz przydatne w ustaleniu matematycznych zależności opisujących te procesy. Wykazanie takiej przydatności było głównym celem niniejszej pracy. Należy podkreślić, że czynione pod tym względem próby w odniesieniu do mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego nie dały dotychczas zadowalających rezultatów [11]. Analiza wyników własnych doświadczeń wykazała, iż opracowana w badaniach wcześniejszych metodyka oznaczania aktywności dehydrogenaz [36, 37, 41] w sposób poprawny określała stan fizjologiczny mikroorganizmów osadu czynnego i poszczególne etapy ich rozwoju w procesie ciągłym.

Szczególnie pomocne w interpretacji zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego było zastosowanie wykresu fazowego [7]. Wykres ten odzwierciedla w sposób chronologiczny kierunek zachodzących zmian. Uzyskuje się taki wykres łącząc liniami prostymi (wektorami) wartości odpowiadające poszczególnym stanom aktywności dehydrogenaz. Sporządzenie wykresu fazowego pozwalało na uchwycenie prawidłowości występujących we wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach. Analizując wyniki tych badań stwierdzono, że punkty pomiarowe naniesione na układ współrzędnych w osiach "aktywność dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego" i "obciążenie substratowe osadu czynnego" tworzą pewne zamknięte obszary (rys. 30). Obszary te wyznaczały odrębne etapy procesu osadu czynnego.

Etap pierwszy obejmował początkowy okres hodowli, w którym następowało formowanie się i aklimatyzacja mieszanej populacji drobnoustrojów osadu czynnego. Etap ten charakteryzował się wysoką aktywnością metaboliczną, nie korelującą z wielkością usuwanego substratu (rys. 6, 16, 20, 28). W przypadkach zastosowania drobnoustrojów wstępnie adaptowanych do określonych substratów w układzie nie pojawiał się ten etap zmian aktywności dehydrogenaz (rys. 11).

Po okresie aklimatyzacji, przy niezbyt raptownych zmianach warunków prowadzenia procesu, następował etap II, w którym pojawiała się wprost proporcjonalna zależność pomiędzy wielkością obciążenia substratowego a oznaczaną aktywnością metaboliczną (rys. 6, 11, 16, 20, 21, 28). W badanych układach modelowych o ciągłym dopływie substratów następowały zmiany

warunków zewnętrznych. Ustalający się odpowiednio do tych warunków etap współzależności pomiędzy obciążeniem substratowym a aktywnością oddechową mikroorganizmów można więc określić jako stan równowagi dynamicznej.

Stan stacjonarny w procesie ciągłym ustala się przy zachowaniu stałych warunków zewnętrznych procesu. Po upływie określonego czasu ustala się wówczas zawartość biomasy w reaktorze, stałe stężenie substratów i wydalanych produktów z układu. Ten stabilny stan równowagi ulega zmianie przy zmianie warunków początkowych (prędkość przepływu lub stężenie substratu), aż do ustalenia się nowego stanu stacjonarnego. Linie łączące wartości charakterystyczne dla poszczególnych stanów stacjonarnych układu są obrazem kierunków zmian zachodzących w tym układzie.

Stan równowagi dynamicznej trwał do przekroczenia pewnego krytycznego obciążenia substratowego, po osiągnięciu którego obserwowano nagły spadek aktywności dehydrogenaz (rys. 20, 21, 28). Aktywność ta szybko osiągała wartości bliskie zera, nawet jeśli obciążenie substratowe wzrastało minimalnie lub nie zmieniało się. Ten etap III nazwać można etapem inhibicji i jego pojawienie się tłumaczyć wystąpieniem zaburzeń związanych z hamowaniem procesów mikrobiologicznych przez nadmiar substratu [6, 11].

Czasami w przebiegu procesu osadu czynnego można było wyodrębnić etap nadwrażliwości drobnoustrojów, poprzedzający bezpośrednio etap inhibicji. W etapie tym mikroorganizmy wykazywały większą aktywność, niż wynikało to z obciążenia substratowego (rys. 20, 21, 30).

Poza punkty obejmujące obszar pomiarowy w stanie równowagi dynamicznej (etap III) wybiegały wyniki notowane wówczas, gdy następował nagły wzrost obciążenia substratowego. Nie obserwowano wtedy wzrostu aktywności dehydrogenaz, występującego w przypadku stopniowego wzrostu obciążenia do tej samej wielkości. Jeśli wzrost ten był raptowny, ale chwilowy, w reaktorze szybko powracał stan równowagi i występowała nadal współzależność pomiędzy obciążeniem substratowym a aktywnością dehydrogenaz. Na wykresie fazowym na takie nagłe wzrosty obciążeń wskazywały mniej lub bardziej poziome, przeciwnie skierowane wektory (rys. 11, 30).

Podobnie grupowały się wyniki pomiarów w układzie współrzędnych o osiach "aktywność dehydrogenaz" i "szybkość zużycia substratu" (rys. 8 i 32). W układzie tym występowały obydwa poprzednio wymienione obszary(etap aklimatyzacji i stan równowagi dynamicznej), a w etapie inhibicji (etap III), częściej niż w poprzednio omawianym układzie współrzędnych, wyodrębnić można było dwa podobszary obejmujące etap nadwrażliwości komórek (etap IIIA) oraz etap zamierania drobnoustrojów (etap IIIB) - rys. 24, 25.

Zwykle czas trwania etapu nadwrażliwości był krótki i charakteryzował się tym, iż oznaczana aktywność dehydrogenaz drobnoustrojów była znacznie wyższa, niż wynikałoby to z pomiarów szybkości rozkładu substratu. Etap ten szybko mijał i drobnoustroje wchodziły w etap zamierania, w którym oznaczana aktywność dehydrogenaz była znikoma lub zerowa. Nie znaczyło to wcale, iż tak samo raptownie malała szybkość degradacji, określana przez

ilośc usuwanego substratu. Przynajmniej nie działo się tak bezpośrednio po zaniku oznaczanej aktywności, ale następowało dopiero po pewnym okresie czasu, przy dalszym dopływie substratu. Wartość końcowa ilości usuwanego substratu w chwili stwierdzenia zupełnego zaniku oznaczanej aktywności oraz czas, po którym od tego momentu zaczęła maleć ta szybkość, były zmienne w różnych doświadczeniach (tabela VI i VIII). Upoważnia to do przypuszczenia, iż odpowiedzialne za ten stan mogły być procesy fizyczne sorpcji składników pożywki, zależne od właściwości aglomeratów osadu czynnego, zmiennych dla określonego przypadku.

Połączenie wykresów, ilustrowanych na rys. 30 i 31 (lub 32), pozwalało na wyznaczenie zależności pomiędzy szybkością biodegradacji V_s a obciążeniem O_s. Uzyskany tą drogą wykres (rys. 33) był zgodny z charakterem krzywych obrazujących zmiany szybkości reakcji biochemicznych w zależności od stężenia substratu, w tym przypadku obciążenia substratowego, z uwzględnieniem inhibicji substratowej [6, 11].

Typowy tok postępowania podczas interpretacji zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów w procesie osadu czynnego z ciągłym dopływem substratu powinien obejmować przede wszystkim graficzne naniesienie uzyskanych rezultatów na układ współrzędnych o osiach: "obciążenie substratowe" - "aktywność dehydrogenaz" z zaznaczeniem dni doświadczeń przy poszczególnych punktach pomiarowych. Na tej podstawie należy stwierdzić, czy dają się wyodrębnić charakterystyczne etapy biodegradacji - etap aklimatyzacji, stan równowagi dynamicznej i etap inhibicji.

Aby opisać matematycznie proces biodegradacji, należy w układzie współrzędnych o osiach: "szybkość zaniku substratu" i "aktywność dehydrogenaz" nanieść punkty pomiarowe wyodrębnione na wykresie poprzednim dla etapu równowagi dynamicznej. Dalszy tok postępowania obejmować powinien typowe działania matematyczne: obliczenie współczynnika korelacji, parametrów prostej regresji oraz przedziału ufności.

4.2. Korelacja pomiędzy aktywnością dehydrogenaz drobnoustrojów a szybkością usunięcia substratu w stanie równowagi dynamicznej procesu osadu czynnego

Intensywność procesu osadu czynnego określano przez pomiar szybkości zaniku (usunięcia) substratu w czasie tego procesu. Wielkość ta nie musi być równoznaczna z ilością zużytą (wykorzystaną) przez drobnoustroje aktywne w procesach biodegradacji substratu. Taka definicja szybkości procesu osadu czynnego jest zgodna z wykorzystywaną metodyką oznaczania stężenia związków organicznych w dopływie i odpływie z reaktora biochemicznego. Określenie stopnia usunięcia zanieczyszczeń organicznych jest także istotne z punktu widzenia ochrony środowiska.

Z wymienionych powodów miarą zawartości zanieczyszczeń nie powinno być oznaczenie specyficznego substratu, gdyż nie wykryłoby się tą drogą częściowo zmetabolizowanych półproduktów, które mogłyby gromadzić się w środowisku. Pomiar ilości substratu tym sposobem byłby zresztą praktycznie niewykonalny w przypadku mieszaniny różnych substancji. Dlatego przydatne mogą być tutaj metody, które pozwalają określić ogólną ilość substancji organicznej w dopływie i odpływie reaktora biochemicznego. Z historycznych względów wykorzystuje się do tego celu pomiar pięciodobowego biochemicznego tlenu - BZT_5.

Zasadnicza wada tego oznaczenia polega na tym, że na wynik składają się zarówno reakcje pierwotne związane z biodegradacją substratu, jak również procesy wtórne endogennej respiracji, niemożliwe do uwzględnienia przez wykonanie ślepej próby, gdyż zależne one są głównie od ilości powstałej biomasy i następującej sukcesji organizmów (co w ślepej próbie nie występuje). Wymienionych niedogodności nie posiada oznaczanie sumarycznej ilości związków organicznych za pomocą pomiarów chemicznego zapotrzebowania tlenu - ChZT, lub ogólnego węgla organicznego - OWO. Prostota i dostępność odczynników spowodowała, iż w wykonanych badaniach do oceny kinetyki procesu osadu czynnego wykorzystano oznaczanie ChZT.

Sporządzenie wykresu fazowego dla ciągłego procesu osadu czynnego oraz wyodrębnienie za pomocą tego wykresu określonych etapów rozwoju drobnoustrojów pozwoliły na ustalenie matematycznej zależności pomiędzy oznaczaną aktywnością dehydrogenaz a szybkością zaniku związków organicznych w etapie równowagi dynamicznej. W tym okresie, zgodnie z rys. 31, występować powinna korelacja pomiędzy szybkością procesu a aktywnością enzymatyczną komórek:

$$V = f(A_d) \qquad (1)$$

Uwzględniając odpowiednie współczynniki liczbowe otrzymuje się ogólne równanie:

$$V_v = a\,A_v + b \qquad (2)$$

Uwzględniając, że

$$V_v = (S_o - S_e)\,\frac{Q}{F}$$

otrzymuje się

$$(S_o - S_e)\,\frac{Q}{F} = a\,A_v + b \qquad (3)$$

lub też wprowadzając

$$\frac{Q}{F} = D = \frac{1}{T}$$

uzyskuje się

$$(S_o - S_e)D = a A_v + b \qquad (4)$$

lub

$$\frac{S_o - S_e}{T} = a A_v + b \qquad (5)$$

Jeśli szybkość procesu i aktywność dehydrogenaz drobnoustrojów wyrazi się w przeliczeniu na jednostkę masy drobnoustrojów biorących udział w procesie, wówczas otrzymuje się:

$$\frac{S_o - S_e}{X \cdot T} = a A_x + b \qquad (6)$$

lub

$$V_x = a A_x + b \qquad (7)$$

Lepszą korelację uzyskać można pomiędzy szybkością usuwania substratu V_v i aktywnością w jednostce objętości A_v, niż pomiędzy tymi wielkościami przeliczonymi na ilość biomasy, to znaczy pomiędzy szybkością właściwą V_x i aktywnością właściwą A_x. W przypadku określonej szybkości procesu degradacyjnego V_v można uzyskać ten sam efekt zarówno przez zwiększenie aktywności enzymatycznej małej ilości biomasy - na przykład w czasie nagłego, ale nie niweczącego równowagę dynamiczną hodowli wzrostu obciążenia - lub też przez niższą aktywność enzymatyczna większej ilości drobnoustrojów. W tej sytuacji zamiast jednego pokrywającego się w układzie współrzędnych $V_v : A_v$ punktu dla dwu pomiarów uzyskuje się dwa punkty w układzie współrzędnych $V_x : A_x$. Zwiększa to prawdopodobieństwo wzrostu rozrzutu wyników oznaczenia.

Potwierdzeniem takiego wniosku są wyniki uzyskane podczas biologicznego oczyszczania wód odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego i ftalowego. Wyliczony dla etapu równowagi dynamicznej procesu współczynnik korelacji pomiędzy wartościami szybkości zaniku substratu i aktywności dehydrogenaz wynosił 0,96 dla "maleinowego" osadu czynnego (rys. 24) oraz 0,95 dla "ftalowego" osadu czynnego (rys. 25) w układzie osiowym $V_v : A_v$. Dla układu współrzędnych $V_x : A_x$ wartości te były niższe i wynosiły odpowiednio 0,94 dla modelu I (rys. 26) oraz 0,89 dla modelu II (rys. 27).

Wykres zależności szybkości reakcji biodegradacyjnych od aktywności enzymatycznej mikroorganizmów może być przesunięty w stosunku do początku układu współrzędnych o wielkość zależną głównie od czułości stosowanej metodyki oznaczania aktywności dehydrogenaz oraz od swoistych cech samej badanej populacji drobnoustrojów a także sprawności osadnika wtórnego (rys. 9, 14, 19, 24, 25, 29). Te dwie ostatnie przyczyny mogą być ze sobą ściśle powiązane.

Swoiste cechy populacji, jak zdolność sorpcyjna, są zależne od fizjologicznych i morfologicznych cech aglomeratów osadu czynnego. Szybkość namnażania się drobnoustrojów w połączeniu z niecałkowitym oddzieleniem biomasy do cieczy w osadniku wtórnym mogą powodować wskutek procesów fizycznych stały ubytek substratu wprowadzanego do reaktora. Wartość współczynnika "b" w równaniu (2) będzie więc wyższa w hodowlach, w których stale odprowadza się część wytworzonej biomasy, niż w przypadkach w których ze względu na stosowane parametry technologiczne procesu nie dochodzi do wytwarzania i usuwania nadmiaru biomasy (rys. 34). Pierwsza sytuacja występuje przykładowo w procesach mikrobiologicznych wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym lub wysoko obciążonym procesie osadu czynnego. Natomiast druga sytuacja pojawia się w nisko obciążonym procesie osadu czynnego, w którym znaczna część nadmiaru wytworzonej biomasy ulega autooksydacji. W przypadku nieusuwania nadmiaru biomasy oraz stosowania odpowiednio czułej metodyki analitycznej wykres zależności szybkości biodegradacji od aktywności dehydrogenaz przecinać może oś odciętych. Wówczas współczynnik "b" równania (2) będzie miał wartości ujemne, a miejsce przecięcia wykresu z osią odciętych odpowiadać będzie wielkości endogennej respiracji mikroorganizmów.

Trudniejsza w interpretacji jest duża zmienność wartości współczynnika "a" w równaniu (2)- szczególnie w przypadku doświadczeń z wykorzystaniem tego samego substratu. Tymczasem równania kinetyki biodegradacji fenolu w dwu seriach badań posiadały różne wielkości liczbowe współczynników (tabela IX). Dla I serii uzyskano:

$$V_v = 0{,}052\ A_v + 0{,}029$$

natomiast w II serii doświadczeń:

$$V_v = 0{,}020\ A_v + 0{,}16$$

Współczynnik "a" wyznaczony jest jako tangens wykresu w układzie osiowym: "aktywność dehydrogenaz" - "szybkość zaniku substratu" uzyskanego dla etapu równowagi dynamicznej procesu osadu czynnego. Wartość "a" odpowiada więc zmianie szybkości zużycia substratu powodowanej zwiększeniem aktywności enzymatycznej mikroorganizmów o jedną jednostkę. Dla bardziej czułej metodyki oznaczania aktywności dehydrogenaz wartość ta będzie więc niższa. Taka jest prawdopodobna przyczyna ponad dwukrotnie większej wartości współczynnika "a" wyznaczonego w I serii badań w porównaniu z II serią doświadczeń nad biodegradacją fenolu (tabela IX). Znamienne, że wartość współczynnika "a", obliczona dla wyników badań Stachowicz [62], jest bardzo zbliżona do wielkości uzyskanej w I serii badań własnych nad biodegradacją fenolu i wynosi 0,51 (tabela IX).

Swoiste cechy populacji, jak zdolność sorpcyjna, są zależne od fizjologicznych i morfologicznych cech aglomeratów osadu czynnego. Szybkość namnażania się drobnoustrojów w połączeniu z niecałkowitym oddzieleniem biomasy do cieczy w osadniku wtórnym mogą powodować wskutek procesów fizycznych stały ubytek substratu wprowadzanego do reaktora. Wartość współczynnika "b" w równaniu (2) będzie więc wyższa w hodowlach, w których stale odprowadza się część wytworzonej biomasy, niż w przypadkach w których ze względu na stosowane parametry technologiczne procesu nie dochodzi do wytwarzania i usuwania nadmiaru biomasy (rys. 34). Pierwsza sytuacja występuje przykładowo w procesach mikrobiologicznych wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym lub wysoko obciążonym procesie osadu czynnego. Natomiast druga sytuacja pojawia się w nisko obciążonym procesie osadu czynnego, w którym znaczna część nadmiaru wytworzonej biomasy ulega autooksydacji. W przypadku nieusuwania nadmiaru biomasy oraz stosowania odpowiednio czułej metodyki analitycznej wykres zależności szybkości biodegradacji od aktywności dehydrogenaz przecinać może oś odciętych. Wówczas współczynnik "b" równania (2) będzie miał wartości ujemne, a miejsce przecięcia wykresu z osią odciętych odpowiadać będzie wielkości endogennej respiracji mikroorganizmów.

Trudniejsza w interpretacji jest duża zmienność wartości współczynnika "a" w równaniu (2)- szczególnie w przypadku doświadczeń z wykorzystaniem tego samego substratu. Tymczasem równania kinetyki biodegradacji fenolu w dwu seriach badań posiadały różne wielkości liczbowe współczynników (tabela IX). Dla I serii uzyskano:

$$V_v = 0{,}052\ A_v + 0{,}029$$

natomiast w II serii doświadczeń:

$$V_v = 0{,}020\ A_v + 0{,}16$$

Współczynnik "a" wyznaczony jest jako tangens wykresu w układzie osiowym: "aktywność dehydrogenaz" - "szybkość zaniku substratu" uzyskanego dla etapu równowagi dynamicznej procesu osadu czynnego. Wartość "a" odpowiada więc zmianie szybkości zużycia substratu powodowanej zwiększeniem aktywności enzymatycznej mikroorganizmów o jedną jednostkę. Dla bardziej czułej metodyki oznaczania aktywności dehydrogenaz wartość ta będzie więc niższa. Taka jest prawdopodobna przyczyna ponad dwukrotnie większej wartości współczynnika "a" wyznaczonego w I serii badań w porównaniu z II serią doświadczeń nad biodegradacją fenolu (tabela IX). Znamienne, że wartość współczynnika "a", obliczona dla wyników badań Stachowicz [62], jest bardzo zbliżona do wielkości uzyskanej w I serii badań własnych nad biodegradacją fenolu i wynosi 0,51 (tabela IX).

Innym powodem fluktuacji wartości współczynnika "a" mogą być zmiany strukturalne kłaczków osadu czynnego. Skutkiem takich zmian może być zróżnicowanie dostępności TTC do komórek mikroorganizmów w aglomeracie osadu czynnego. Nawet proste obserwacje wizualne potwierdzają występowanie w kłaczkach osadu czynnego miejsc nie zabarwiających się podczas oznaczania aktywności dehydrogenaz za pomocą testu TTC. Miejsca te mogą odpowiadać nieaktywnym fragmentom kłaczków, ale równie prawdopodobne jest założenie, iż są to miejsca niedostępne dla TTC. Wynika stąd, że podczas stosowania metodyki analitycznej testu TTC o jednakowej czułości wartość oznaczanej aktywności zależeć może od wielkości aglomeratu osadu czynnego dostępnego dla TTC. Wpłynie to więc na wartość współczynnika "a" równania (2). Powoduje to także, iż uzyskane wyniki oznaczania aktywności dehydrogenaz będą odnosić się jedynie do określonej hodowli drobnoustrojów, zmniejszając szansę porównania wyników uzyskanych w badaniach z wykorzystaniem zespołów mikroorganizmów hodowanych w odmiennych warunkach.

W przypadku mikrobiologicznego wykorzystywania różnych substratów pojawiają się dodatkowe powody odmienności wielkości liczbowych współczynników w matematycznym równaniu zależności pomiędzy oznaczoną aktywnością dehydrogenaz A_v i szybkością zaniku substratu V_v. Znamienne, iż zależność matematyczna pomiędzy obciążeniem substratowym O_v i szybkością procesu V_v wykazuje większą zbieżność tych wielkości (tabela IX). Stopień wykorzystania dopływającego substratu zmienia się od 0,78 dla I serii badań nad biodegradacją fenolu do 0,87 dla biologicznego rozkładu glukozy. Natomiast współczynniki "a" równań opisujących zależność pomiędzy aktywnością dehydrogenaz A_v i szybkością zaniku substratu V_v posiadały skrajne wartości różniące się aż pięciokrotnie. Dla biodegradacji fenolu w II serii doświadczeń równanie to miało postać:

$$V_v = 0{,}02\ A_v + 0{,}16$$

natomiast dla biologicznego oczyszczania wód odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego:

$$V_v = 0{,}10\ A_v - 0{,}25$$

Istnieje więc duże zróżnicowanie ilości substratu przekształconego w procesach biologicznego utleniania przez drobnoustroje osadu czynnego, których intensywność określamy przez oznaczanie aktywności dehydrogenaz, w porównaniu z ilością usuwaną w reaktorze biochemicznym. Wynikać to może z różnic metabolizmu, jakiemu podlegają poszczególne substraty, efektów energetycznych przemian oksydacyjnych [25] i zjawisk sorpcyjnych.

Innym powodem fluktuacji wartości współczynnika "a" mogą być zmiany strukturalne kłaczków osadu czynnego. Skutkiem takich zmian może być zróżnicowanie dostępności TTC do komórek mikroorganizmów w aglomeracie osadu czynnego. Nawet proste obserwacje wizualne potwierdzają występowanie w kłaczkach osadu czynnego miejsc nie zabarwiających się podczas oznaczania aktywności dehydrogenaz za pomocą testu TTC. Miejsca te mogą odpowiadać nieaktywnym fragmentom kłaczków, ale równie prawdopodobne jest założenie, iż są to miejsca niedostępne dla TTC. Wynika stąd, że podczas stosowania metodyki analitycznej testu TTC o jednakowej czułości wartość oznaczanej aktywności zależeć może od wielkości aglomeratu osadu czynnego dostępnego dla TTC. Wpłynie to więc na wartość współczynnika "a" równania (2). Powoduje to także, iż uzyskane wyniki oznaczania aktywności dehydrogenaz będą odnosić się jedynie do określonej hodowli drobnoustrojów, zmniejszając szansę porównania wyników uzyskanych w badaniach z wykorzystaniem zespołów mikroorganizmów hodowanych w odmiennych warunkach.

W przypadku mikrobiologicznego wykorzystywania różnych substratów pojawiają się dodatkowe powody odmienności wielkości liczbowych współczynników w matematycznym równaniu zależności pomiędzy oznaczoną aktywnością dehydrogenaz A_v i szybkością zaniku substratu V_v. Znamienne, iż zależność matematyczna pomiędzy obciążeniem substratowym O_v i szybkością procesu V_v wykazuje większą zbieżność tych wielkości (tabela IX). Stopień wykorzystania dopływającego substratu zmienia się od 0,78 dla I serii badań nad biodegradacją fenolu do 0,87 dla biologicznego rozkładu glukozy. Natomiast współczynniki "a" równań opisujących zależność pomiędzy aktywnością dehydrogenaz A_v i szybkością zaniku substratu V_v posiadały skrajne wartości różniące się aż pięciokrotnie. Dla biodegradacji fenolu w II serii doświadczeń równanie to miało postać:

$$V_v = 0{,}02\ A_v + 0{,}16$$

natomiast dla biologicznego oczyszczania wód odpadowych z produkcji bezwodnika maleinowego:

$$V_v = 0{,}10\ A_v - 0{,}25$$

Istnieje więc duże zróżnicowanie ilości substratu przekształconego w procesach biologicznego utleniania przez drobnoustroje osadu czynnego, których intensywność określamy przez oznaczanie aktywności dehydrogenaz, w porównaniu z ilością usuwaną w reaktorze biochemicznym. Wynikać to może z różnic metabolizmu, jakiemu podlegają poszczególne substraty, efektów energetycznych przemian oksydacyjnych [25] i zjawisk sorpcyjnych.

4.3. Analiza kinetyki procesu osadu czynnego z uwzględnieniem aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów

Opis matematyczny jakiegoś procesu wymaga jednoznacznego zdefiniowania stosowanych wielkości i ich jednostek. W podanym równaniu dotyczy to przede wszystkim pojęcia aktywności dehydrogenazowej.

Aktywność dehydrogenaz mikroorganizmów zawartych w jednostce objętości komory osadu czynnego opisać można następującym równaniem:

$$A_v = A_B \times B \qquad (8)$$

gdzie:

A_v - ogólna aktywność dehydrogenaz drobnoustrojów w jednostkowej objętości komory,

A_B - aktywność dehydrogenaz jednostkowej ilości żywych drobnoustrojów (aktywność właściwa),

B - ilość żywych (aktywnych) drobnoustrojów w jednostce objętości komory.

W takim ujęciu uściślenia wymaga pojęcie ilości żywych (aktywnych) mikroorganizmów. Określenie "ilość żywych drobnoustrojów" dotyczyć bowiem może zarówno liczby drobnoustrojów aktywnych metabolicznie w jednostce objętości reaktora, jak również ich masy w tej objętości. W obu przypadkach pod pojęciem tym rozumie się tutaj wszystkie komórki wykazujące aktywność metaboliczną, niezależnie od tego, czy posiadają one zdolność do rozmnażania się. Uściślenie tego jest o tyle istotne, iż w mieszanych populacjach drobnoustrojowych osadu czynnego przeważającą część stanowią komórki nie rozmnażające się. Wykazują one jednak aktywność enzymatyczną i odgrywają istotną rolę w procesach biodegradacji [65]. Przy takim rozumieniu pojęcia "ilości żywych drobnoustrojów" okazuje się, że podanie tej wielkości przez liczbę komórek jest praktycznie niewykonalne. Metody określania ogólnej liczby komórek nie pozwalają na zróżnicowanie aktywnych (według podanej definicji) i nieaktywnych metabolicznie drobnoustrojów. Nie nadaje się do tego celu również tradycyjny sposób określania liczby żywych komórek przez posiewy na płytkach. Wyklucza to komórki aktywne metabolicznie, ale niezdolne do rozmnażania się. Metody płytkowej nie należy więc stosować do liczenia mikroorganizmów różnych rodzajów w zespołach mieszanych [57].

Dogodnym więc, chociaż umownym sposobem określania ilości drobnoustrojów jest wyznaczenie ich ogólnej masy aktywnej (biomasa). Ze względu na prostotę i szybkość wykonania najbardziej rozpowszechnione jest określenie suchej masy (sm) oraz suchej masy organicznej (smo). W tym przypadku we wzorze (8) ilość mikroorganizmów B zastąpić można przez zawartość biomasy X wyrażonej w kg sm/m^3. Dla takich założeń otrzymuje się:

$$A_v = A_x \cdot X \qquad (9)$$

gdzie:

A_v - ogólna aktywność dehydrogenaz drobnoustrojów, g . TF/m^3 . h,
A_x - aktywność właściwa, g . TF/kg sm . h,
X - biomasa drobnoustrojów, kg sm/m^3.

Bliższa analiza wzoru (9), z uwzględnieniem poczynionych ustaleń dotyczących pojęcia ilości aktywnych drobnoustrojów, pozwala lepiej interpretować przebieg procesów biodegradacyjnych. Na ogólną aktywność składać się będzie suma aktywności wykazywana przez biomasę drobnoustrojów żywych, czynnych metabolicznie, ale nie rozmnażających się oraz tych mikroorganizmów, które również się namnażają. Ująć to można następująco (rys. 1):

$$A_x = \alpha A_x^{\mu} + \beta A_x^{m} \qquad (10)$$

gdzie:

α - frakcja drobnoustrojów rozmnażających się,
β - frakcja drobnoustrojów nie rozmnażających się, ale metabolicznie aktywnych.

Weddle i Jenkins [61] stwierdzili, że podczas zmian warunków środowiskowych (głównie substratowych) w zooglealnych skupiskach bakteryjnych osadu czynnego znacznie zmienia się stosunek frakcji rozmnażającej się drobnoustrojów do tej, która zdolności tych nie posiada, ale jest metabolicznie czynna. Wykazany więc wzrost aktywności właściwej A_x nie musi być wywołany wzrostem aktywności enzymów, na co wskazywałby wzrost wyznaczanej aktywności w przeliczeniu na biomasę. Może to w większym stopniu być spowodowane przez wzrost frakcji namnażających się, enzymatycznie aktywnych drobnoustrojów w tej biomasie.

Ilustrację takiej sytuacji jest rys. 2. Drobnoustroje w okresach I i II wykazują różną ogólną aktywność oddechową w jednostce objętości A_v, przy niezmiennej ilości biomasy zawartej w tej objętości X, czyli

$$A_v^{I} < A_v^{II}$$

Ponieważ zgodnie z równaniem (9):

$$A_v^{I} = A_x^{I} \cdot X^{I}$$

$$A_v^{II} = A_x^{II} \cdot X^{II}$$

to znaczy $\quad A_x^{I} \cdot X^{I} < A_x^{II} \cdot X^{II}$

więc w przypadku, gdy $X^{I} = X^{II}$, wykazana różnica aktywności wynikać musi z nierówności:

$$A_x^{I} < A_x^{II}$$

Zgodnie z równaniem (10):

$$A_x^{I} = \alpha_1 \cdot A_x^{\mu} + \beta_1 \cdot A_x^{m}$$

$$A_x^{II} = \alpha_2 \cdot A_x^{\mu} + \beta_2 \cdot A_x^{m}$$

czyli $\quad \alpha_1 \cdot A_x^{\mu} + \beta_1 \cdot A_x^{m} < \alpha_2 \cdot A_x^{\mu} + \beta_2 \cdot A_x^{m}$

stąd $\quad A_x^{m}(\beta_1 - \beta_2) < A_x^{\mu}(\alpha_2 - \alpha_1).$

Ponieważ $\quad \alpha_1 + \beta_1 = \alpha_2 + \beta_2 = 1$

więc $\quad \beta_1 - \beta_2 = \alpha_2 - \alpha_1.$

Dlatego nierówność $\quad A_x^{m} \cdot \Delta\beta < A_x^{\mu} \cdot \Delta\alpha$

sprowadza się do następującej postaci:

$$A_x^{m} < A_x^{\mu} \qquad (11)$$

Nierówność (11) jest zgodna z intuicyjnym, a jednocześnie logicznym oczekiwaniem, że aktywność metaboliczna jednostkowej biomasy komórek frakcji wykazujących zdolność do podziału (rozmnażania się) A_x^{μ} powinna być większa od aktywności enzymatycznej komórek nie posiadających tej właściwości A_x^{m}. Wynika to z większego zapotrzebowania energetycznego komórek tej pierwszej frakcji, koniecznego do prowadzenia procesów biosyntezy nowych komórek. W efekcie, procentowy udział aktywności spowodowanej procesami metabolicznymi komórek rozmnażających się A_x^{μ} w ogólnej aktywności właściwej A_x będzie zawsze większy, niż wynika to z procentowego udziału tych komórek w sumarycznej ilości komórek określonej przez wielkość biomasy. Uwidacznia to dolna część rys. 2, co oznacza, że:

$$\frac{\alpha \cdot A_x^{\mu}}{A_x} > \alpha$$

Stosunek ilości komórek zdolnych do podziału do ogólnej ilości aktywnych metabolicznie organizmów będzie uzależniony od ilości dostępnego sub-

stratu (obciążenia substratowego). W warunkach "ubogich", gdy ilość substancji pokarmowych nie jest zbyt duża, większa jego część będzie zużywana na podtrzymanie podstawowych funkcji komórek drobnoustrojów. Ich ilość rozmnażająca będzie wtedy mała. Wzrost obciążenia substratowego spowoduje natomiast zwiększenie liczby komórek ulegających podziałowi. Pomimo iż opisana sytuacja nie uwzględnia możliwości wystąpienia innych czynników ograniczających (hamujących) rozwój komórek, to dla większości przypadków jest ona słuszna.

W sytuacji, gdy nastąpi taki wzrost obciążenia substratowego, iż cała biomasa będzie zdolna do rozmnażania ($\alpha = 1$, $\beta = 0$), uzyskuje się:

$$A_x = \alpha A_x^{\mu} + \beta A_x^{m} = A_x^{\mu}$$

Pamiętając, iż A_x^{μ} jest większe niż A_x^{m}, można stwierdzić, że A_x jest w tym wypadku górną granicą aktywności właściwej A_x^{max}, jaką osiągnąć mogą drobnoustroje. Dalszy wzrost aktywności ogólnej A_v nastąpić może jedynie poprzez zwiększenie stężenia biomasy X w reaktorze. Zapewne następować to będzie równocześnie ze wzrostem frakcji zdolnej do rozmnażania się. Tym zasadniej można uważać oznaczoną ogólną aktywność metaboliczną za iloczyn aktywności dehydrogenazowej i ilości biomasy. W iloczynie tym wzajemny stosunek tych dwu wielkości może się zmieniać. Występuje to wyraźnie w hodowlach z okresowym wprowadzeniem substratu.

W niektórych przypadkach współzależnie ze zmianami oznaczanej aktywności dehydrogenaz następują zmiany ilości biomasy [51]. Sytuacja taka pojawia się wówczas, gdy szybkość zużycia substratu nie jest zbyt duża. W tym przypadku wzrost oznaczanej aktywności dehydrogenaz jest głównie powodowany przez przyrost ilości mikroorganizmów.

Jak wykazują natomiast własne doświadczenia [35], w wypadku prawidłowo adaptowanych drobnoustrojów lub też niewielkiej ilości dodanego substratu obserwuje się szybkie zużycie tego substratu, duże zmiany aktywności dehydrogenaz oraz małe przyrosty biomasy drobnoustrojów.

4.4. Potwierdzenie tezy pracy w oparciu o wyniki badań innych autorów

W dostępnych publikacjach niewiele można znaleźć materiałów, które by pozwalały na prześledzenie procesu osadu czynnego w sposób polegający na wyodrębnieniu charakterystycznych etapów tego procesu w oparciu o oznaczenia aktywności dehydrogenaz. Umożliwiłoby to następnie obliczenie współczynnika korelacji, parametrów prostej regresji oraz przedziału ufności dla etapu równowagi dynamicznej. Jedynie doświadczenia Stachowicz [60], wykonane w innym celu i z tego punktu widzenia nie rozpatrywane, zawierają wyniki umożliwiające potwierdzenie przeprowadzonych wywodów.

Wykres fazowy zależności aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego od obciążenia substratowego (rys. 28, tabela VIII), wykonany w oparciu o dane zawarte w pracy Stachowicz, pozwolił wyodrębnić etap aklimatyzacji drobnoustrojów, stan równowagi dynamicznej oraz etap inhibicji. W okresie równowagi dynamicznej (rys. 24) szybkość procesu biodegradacji dała się, zgodnie z omówionymi poprzednio cechami tego stanu opisać przez szczegółowe równanie matematyczne wynikające z równania (2):

$$V_v = 0{,}051\ A_v + 0{,}125\ [\mathrm{kg\ ChZT} \cdot m^{-3} \cdot d^{-1}]$$

Niemożność wykorzystania wyników doświadczeń innych autorów nad oznaczaniem aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów podczas biodegradacji związków organicznych wynika najczęściej z braku kompletnych informacji. Dotyczy to głównie niepodawania uzyskiwanych wyników w chronologicznej kolejności, co uniemożliwia sporządzenie wykresu fazowego.

5. STRESZCZENIE I WNIOSKI

1. Na podstawie dotychczas opublikowanych prac doświadczalnych i badań własnych nad biodegradacją związków organicznych przez mieszane populacje drobnoustrojów osadu czynnego postawiono tezę, iż w celu określenia ogólniejszych prawidłowości rządzących tymi procesami przydatne jest uwzględnienie aktualnego stanu fizjologicznego drobnoustrojów. Stan ten w dogodny sposób określa aktywność dehydrogenaz drobnoustrojów.

2. Zasadnicze doświadczenia wykonane w ramach niniejszej pracy zmierzały do ustalenia zależności pomiędzy oznaczaną aktywnością dehydrogenaz mikroorganizmów a podstawowymi parametrami charakteryzującymi proces osadu czynnego - obciążeniem substratowym oraz szybkością usuwania substratu.

3. Badania prowadzono w układach modelowych z użyciem drobnoustrojów osadu czynnego z ciągłym dopływem substratu. Substratem były zarówno czyste związki organiczne (fenol lub glukoza) wzbogacone niezbędnymi nieorganicznymi związkami azotu i fosforu, jak również rzeczywiste wody odpadowe z przemysłu syntezy organicznej (produkcja bezwodnika maleinowego oraz ftalowego).

4. Wykorzystanie wykresu fazowego, który uwzględniał chronologię zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów - w zależności od parametrów technologicznych procesu osadu czynnego - umożliwiło graficzne wyodrębnienie poszczególnych etapów procesu biodegradacyjnego. Był to etap adaptacji drobnoustrojów, etap równowagi dynamicznej, etap nadwrażliwości mikroorganizmów oraz etap ich zamierania.

5. Etap pierwszy procesu osadu czynnego - adaptacja mikroorganizmów - obejmował okres formowania się zespołu drobnoustrojów oraz jego przystosowania się do warunków środowiskowych. Etap ten charakteryzował się wysoką aktywnością dehydrogenaz, niewspółmierną z wielkością usuwanego substratu.

6. Po tym okresie, przy niezbyt raptownych zmianach warunków środowiskowych, ustalał się stan równowagi dynamicznej, w którym występowała wprost proporcjonalna współzależność pomiędzy wielkością obciążenia substratowego a oznaczoną aktywnością dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego.

7. W stanie równowagi dynamicznej, w którym z zasady prowadzi się bioinżynieryjne procesy ciągłe, szybkość zaniku substratu była wprost proporcjonalna do oznaczanej aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów (współczynnik korelacji > 0,9). Opisać to można równaniem:

$$V_v = a A_v + b$$

Wartość współczynników a i b była zależna od czułości stosowanej metodyki oznaczania aktywności dehydrogenaz, rodzaju substratu przyswajanego przez drobnoustroje, swoistych cech badanego zespołu drobnoustrojów osadu czynnego (głównie struktury zooglealnych skupisk) oraz parametrów technicznych stosowanych urządzeń.

8. Ogólna aktywność drobnoustrojów A_v uwzględnia zarówno wielkość biomasy X, uczestniczących w procesie biodegradacji mikroorganizmów, jak również ich aktywność właściwą A_x i określona jest równaniem:

$$A_v = X \cdot A_x$$

9. Poza punkty obejmujące obszar pomiarowy w etapie równowagi dynamicznej wybiegały wyniki notowane wówczas, gdy następował nagły wzrost obciążenia substratowego. Nie obserwowano wtedy wzrostu aktywności dehydrogenaz, występującego w przypadku stopniowego wzrostu obciążenia do tej samej wielkości. Jeśli wzrost obciążenia był raptowny, ale chwilowy, w reaktorze szybko powracał stan równowagi i występowała w dalszym ciągu wprost proporcjonalna współzależność pomiędzy obciążeniem a aktywnością dehydrogenaz drobnoustrojów osadu czynnego.

10. Po przekroczeniu określonego obciążenia krytycznego obserwowano często występowanie etapu nadwrażliwości komórek drobnoustrojów. Czas trwania tego etapu był krótki i charakteryzował się tym, iż oznaczana aktywność dehydrogenaz była znacznie wyższa, niż wynikałoby to z pomiarów szybkości biodegradacji substratu. Etap ten szybko mijał i drobnoustroje wchodziły w etap zamierania, w którym oznaczana aktywność dehydrogenaz raptownie malała do zera.

11. Przeprowadzone badania potwierdziły wysuniętą tezę, iż odpowiednio opracowana metodyka analityczna oznaczania aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów pozwala wykorzystywać zmiany tej aktywności do opisu dynamiki procesu biodegradacji związków organicznych przez mieszane populacje drobnoustrojów w procesie osadu czynnego. Wskutek wprowadzenia do rownań kinetyki procesu osadu czynnego parametru uwzględniającego stan fizjologiczny mikroorganizmu zmniejszeniu uległa liczba istotnych zmiennych występujących w matematycznym modelu tego procesu. Wydaje się, iż uzyskane rezultaty mają szersze znaczenie i mogłyby znaleźć zastosowanie w charakterystyce przebiegu mikrobiologicznych procesów bio-

inżynieryjnych zarówno z zastosowaniem mieszanych, jak również monokulturowych hodowli drobnoustrojów.

LITERATURA

[1] Bożko L., Kańska Z.: Test TTC w zastosowaniu do badania aktywności dehydrogenazowej osadu czynnego. Prace Nauk. Polit. W-wskiej, Budownictwo 21, Warszawa 1972.

[2] Bucksteeg W., Thiele H.: Verbesserung der Keimzählungstechnik in der Wasserbakteriologie druch Anwendung von TTC. Zentralblatt f. Bakt., Parasit., Infekt. u. Hygiene Abt. II, 111, 235, 1958.

[3] Bucksteeg W., Thiele H.: Die Beurteilung von Abwasser und Schlamm mittels TTC. Gas u. Wasserfach 100, 916, 1959.

[4] Bucksteeg W., Thiele H.: Beziehung zwischen biochemischer Abbauleistung und Reduktasenaktivität von Belebtschlamm. Gas u Wasserfach 105 1278,1964.

[5] Buraczewski G.: Wpływ obciążenia osadu czynnego na aktywność dehydrogenaz. Gaz, Woda i Techn. Sanit. 48, 205, 1974.

[6] Chmiel A.: Wybrane zagadnienia kinetyki procesów mikrobiologicznych. Post. Mikrobiologii 12, 21, 1974.

[7] Chmielowski J., Kłapcińska B., Łabużek S., Danch A., Marczyński B., Mrozowska J., Nowak E., Palusińska M.: Kinetics of biodegradation of phenolic substrates by activated sludge microorganisms. Pol. Arch. Hydrobiol. 22, 327, 1975.

[8] Czernawski D.S., Romanowski J.M., Stiepanowa N.W.: Modelowanie matematyczne w biofizyce. PWN, Warszawa 1979.

[9] Dias F.F., Bhat J.V.: Microbial ecology of activated sludge. Appl. Mikrobiol. - 12, 412, 1964.

[10] Eckenfelder W.W., O'Connor D.J.: Biological waste treatment. McMillan Comp. 1961.

[11] Eckenfelder W.W., Malina J.F., Gloyna E.F. Ford D.L.: Physical, chemical and biological processes. Univ. of Texas, Austin 1967.

[12] Edwards V.H.: The influence of high substrate concentrations on microbial kineties. Biot. Bioengng 12, 675, 1970.

[13] Farber E., Sternberg W.H., Dunlap Ch.E.: Histochemical localisation of specific oxidative enzyms. J. Histochem. Cytochem. 4, 284, 1956.

[14] Gańczarczyk J.: Oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego. Arkady, Warszawa 1969.

[15] Glenner G.G., Burtner H.J., Brown G.W.J.: The histochemical demonstration of monoamine oxidase activity by tetrazolium salts. J. Histochem. Cytochem. 5, 591, 1957.

[16] Halasz A.: Zusamenhang zwischen Dehydrogenasenaktivität und Wachstumrate des Bilebtschlammes. Schweiz. Z. f. Hydrobiologie 34, 1, 1972.

[17] Hermanowicz W., Dożańska W., Dojlido J., Koziorowski B.: Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków. Arkady, Warszawa 1976.

[18] Jakubowska J., Włodarczyk M.: Ocena aktywności suszonych drożdży piekarniczych w oparciu o test tetrazoliowy i fermentację cukrów. Post. Mikrobiologii 9, 569, 1970.

[19] Jerchel D., Mohle W.: Die Bestimmung des Reduktionspotential von Tetrazoliumverbindungen. Ber. deutsch. chem. Ges. 77, 591, 1944.

[20] Jones P.H., Prasad D.: The use of tetrazolium salts as a measure of sludge activity. J. Wat. Pol. Contr. Fed. 41, R 441, 1969.

[21] Kałmykowa G.J., Lazarewa M.P. Rogowskaja C.I., Skidrow I.W., Tichaja N.B.: Mikrobiologiczeskaja charaktieristika biocenozow aktiwnych iłow transformirujuszczich nieprirodnych aromaticzeskije sojedinienija. Wodgeo, 64, 14, 1977.

[22] Klapwijk A., Drent J., Steenvoorden H.A.M.: A modified procedure for the TTC - dehydrogenase test in activated sludge. Wat. Res. 8, 121, 1974.

[23] Kuhn R., Jerchel D.: Über invertseifen. Reduktion von Tetrazoliumsalze durch Bakterien, gerände Hefe und Keimende Samen. Ber.deutsch. chem. Ges. 74, 8 II, 949, 1941.

[24] Kusewicz D., Piątkiewicz A.: Aktywność dehydrogenaz drożdży oznaczana testem tetrazoliowym. Post. Mikrobiologii 9, 563, 1970.

[25] Lebninger A.I.: Bioenergetyka. PWN, Warszawa 1978.

[26] Lelonkiewicz K.: Przystosowanie testu TTC do badania aktywności dehydrogenaz osadów czynnych oczyszczających ścieki pocelulozowe. Przegląd Papierniczy 28, 215, 1972.

[27] Lenhard G.: Die Dehydrogenasenaktivität als Mass für die mikroorganismentätigkeit im Boden. Z. Pflanzenernährung. Düng Bodenkunde. 73, 1, 1956.

[28] Lenhard G., Ross W.R., Du Plooy A.: A study of methods for the classification of bottom deposits of natural waters. Hydrobiologia (Dania) 20, 223, 1962.

[29] Lenhard G.: Dehydrogenase activity as criterion for the determination of foxic effects on biological purification system. Hydrobiologia (Dania) 25, 1, 1963.

[30] Lenhard G., Nourse L.D., Schwartz H.M.: The measurement of dehydrogenase activity of activated sludge. J. Wat. Pol. Contr. Fed. 36, 294, 1964.

[31] Lenhard G.: A standarized procedure for the determination of dehydrogenase activity in samples from anaerobic treatment systems. Wat. Res. 2, 161, 1968.

[32] Malina J.F., Ford D.L., Eckenfelder W.W., Dawis E.M.: Analytical procedures and methods. Univ. of Texas, Austin 1967.

[33] Michaelis L., Menten M.L.: Die Kinetik der Invertasewirkung. Biochem. Z. 43, 333, 1913.

[34] Miksch K.: Test TTC jako wskaźnik toksyczności pestycydów. I Ogólnopolskie Sympozjum "Ekologiczne aspekty chemizacji", Łódź 1972.

[35] Miksch K.: Primienienije opriedielenija degidrogenozowoj aktiwnosti aktiwnogo iła w issledowanijach po biodegradacii powierchnostno aktiwnych wieszczestw. VII Kongres PAV, Sekcja D, 4, 305, Moskwa 1976.

[36] Miksch K.: Kinetyczna metoda oceny stopnia adaptacji osadu czynnego do określonego substratu. XX Konf. "Postęp techniczny w dziedzinie oczyszczania ścieków", Katowice 1977.

[37] Miksch K.: Zastosowanie oznaczenia aktywności dehydrogenaz w procesie biodegradacji ścieków rafineryjnych. Gaz, Woda i Techn. Sanit. 51, 234, 1977.

[38] Miksch K.: Wpływ homogenizacji na aktywność dehydrogenaz określoną metodą testu TTC. Gaz, Woda i Techn. Sanit. 52, 277, 1978.

[39] Miksch K.: Einfluss der TTC - Konzentration auf die Dehydrogenasen aktivität von Mikroorganismen. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 8, 305, 1980.

[40] Miksch K.: Ocena wskaźników szybkości przebiegu procesów biologicznego oczyszczania ścieków. Mat. Konf. "Wysokoefektywne metody oczyszczania ścieków", Część II, 157, Kraków 1981.

[41] Miksch K.: Biologiczne metody oceny aktywności mikroorganizmów osadu czynnego. Postępy Mikrobiologii, 1982, w druku.

[42] Miksch K.: The influence of TTC concentration on determination of activated sludge activity. Water Research, zgłoszone do opublikowania.

[43] Miksch K.: Dobór optymalnej metodyki oznaczania aktywności osadu czynnego za pomocą testu TTC. Vom Wasser. Zgłoszone do opublikowania.

[44] Miksch K.: The influence of dissolved oxygen on the determination of dehydrogenase activity of activated sludge using the method of TTC - test. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 11, 1, 1983.

[45] Miksch K., Zdybiewska M.: Oczyszczanie ścieków z produkcji bezwodnika maleinowego, ftalowego i alkoholi OXO. Sprawozdanie z pracy NB-172/RI-1/79. Inst. Inżynierii Ochrony Środowiska Polit. Śląskiej, Gliwice 1981.

[46] Nachals M.M., Tsou K-C., Souza E., Cheng C.S., Seligman A.M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem. 5, 421, 1957.

[47] Nachlas M.M., Yong A.C., Seligman A.M.: Problems of enzymatic lokalization by chemical reactions applied to tissue sections. J. Histochem. Cytochem. 5, 565 1957.

[48] Orszanskaja F.B.: Opriedielenije diegidrogienaznoj aktiwnosti aktiwnogo iła. Wodgeo 23, 163, 1970.

[49] Paramonow F.F., Ermolajewa M.A., Gorjaczewa N.A.: Modificirowannyj mietod opriedielenii aktiwnosti degidrogienaz w aktiwnom ile i aspekty jego primienienija. Wodgeo, 59, 27, Moskwa 1976.

[50] Pawlaczyk-Szpilowa M., Moskal M., Wertelik J.: Przydatność testów biologicznych do określenia toksyczności niektórych związków chemicznych w wodach. Acta Hydrobiol. 14, 115, 1972.

[51] Pawlaczyk-Szpilowa M., Lejczak B.: Studies on the influence of Chlorphenvinphos, Carbaryl and Propoxur on the enzymatic activies of bacterial species isolated from water. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 6, 342, 1978.

[52] Pearse A.G.E.: Interacellular localisation of dehydrogenase systems using monotetrazolium salts and metal chelation of their formazans. J. Histochem. Cytochem. 5, 5, 1957.

[53] Pitter P.: K problematice dehydrogenazove aktivity aktiwneho kalu. Vodni Hospodarstvi 18, 111, 1968.

[54] Pokasam T.B.S., Dendero N.C.: Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge - Appl. Microbiol. 15, 461, 1966.

[55] Przewłocki J.: Oznaczanie aktywności osadu czynnego. Gaz, Woda i Techn. Sanit. 44, 56, 1970.

[56] Raczkowski W., Stasiak M.: Możliwości zastosowania metody oznaczania dehydrogenazy do kontroli procesu osadu czynnego. Gaz, Woda i Techn. Sanit. 44, 133, 1970.

[57] Ried W.: Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. Angewandte Chemie 64, 291, 1952.

[58] Rosa Ch.G., Tsou K.Ch.: The use of tetranitro-blue tetrazoli for the cytochemical licalisation of succinic dehydrogenase. J. Cell Biology 16, 445, 1963.

[59] Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna. PWRiL, Warszawa 1975.

[60] Shelton E.: Comparison of the reduction of neotetrazolium chloride with the succinoxidase activity of tissue homogenates. J. Histochem. Cytochem. 4, 427, 1956.

[61] Shun Shinh Ch., Stack V.T.Jr.: Temperature effects on energy oxygen requinements in biological oxidation. J. Wat. Pol. Contr. Fed. 41, R 461, 1969.

[62] Stachowicz K.: Badania biologiczne i biochemiczne osadu czynnego oczyszczającego ścieki z zawartością fenolu. Archiwum Ochrony Środowiska 3/4, 57, 1977.

[63] Weddle C.L., Jenkins D.: The vialibity and activity of activated sludge. Wat. Res. 5, 621, 1971.

[64] Wellens H., Zahn R.: Untersuchungen uber die Toxizitätsbestimmung von Abwässern und Abwasserinhaltstoffen nach der Dehydrogenasenaktivität. Chemiker Ztg, 95, 172, 1971.

[65] Weinberg E.D.: Selective inhibition of microbiol growth by the incorporation of TTC in culture media. J. Bacteriology 66, 240, 1953.

[66] Weinbull C.: Observations on the staining of Bacillus Magaterium with trippenyltchazolium. J. Bacteriology 66, 137, 1953.

[67] Weissbach H., Redfield B.G., Glenner G.G., Mitoma Ch.: Tetrazolium reduction as a measure of monoamine oxidase activity in vitro. J. Histochem. Cytochem. 5, 601, 1957.

[68] Wooldrige W.R., Stanafast A.F.P.: The biochemical oxygen demand of sewage. Biochem. J. 27, 1933, cyt. w [63].

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССЕ АКТИВНОГО ИЛА

Р е з ю м е

Проведенные исследования были направлены в сторону определения зависимости между определяемой активностью дегидрогеназов микроорганизмов активного ила и основными параметрами характеризующими процесс активного ила - нагрузкой субстрата и скоростью удаления субстрата.

Исследования велись в образцовых системах с беспрерывной подачей субстрата. Субстратом являлись чистые органические соединения (фенол или глюкоза) обогащенные необходимыми неорганическими соединениями азота и фосфора, а также настоящие отходные воды полученные из промышленности органического синтеза (производство малеинового и фталевого ангидрида).

Использование фазовой диаграммы, которая учитывала хронологию изменений активности дегидрогеназов микроорганизмов в зависимости от технологических параметров активного ила, дало возможность графического выделения отдельных этапов процесса биодеградации. Этот этап является этапом приспособления микроорганизмов, этапом динамического равновесия, этапом сверхчувствительности микроорганизмов и этапом их замирания.

В этапе динамического равновесия скорость замирания субстрата V_v является прямо пропорциональной определенной активности дегидрогеназов микроорганизмов A_v. Математическое уравнение для этого этапа процесса приняло следующий вид:

$$V_v = a A_v + b$$

Величина коэффициентов a и b зависела от чувствительности применяемого метода определения активности дегидрогеназов, от рода субстрата присваиваемого микроорганизмами, от свойственных характеристик исследуемой группы микроорганизмов активного ила (в основном структуры зооглеяльных скоплений) и от технических параметров применяемых устройств.

Общая активность микроорганизмов A_v учитывает величину биомассы X принимаемой участие в процессе биодеградации микроорганизмов, а также их свойственную активность A_x и определяется уравнением:

$$A_v = X \cdot A_x$$

После превышения определенной критической нагрузки часто наблюдается появление этапа сверхчувствительности клеток микроорганизмов. Время продолжения этого этапа было короткое и характеризовалось тем, что определяемая активность дегидрогеназов являлась значительно большей чем это следовалобы из измерений скорости биодеградации субстрата. Этот этап быстро завершался и микроорганизмы переходили в этап замирания, в котором определяемая активность дегидрогеназов внезапно падала к нулю.

Проведенные исследования подтвердили тезис, что соответственно разработанная аналитическая методика определения активности дегидрогеназов микроорганизмов позволяет исспользовать изменения этой активности для описания динамики процессов биодеградации органических соединений смешанными популяциами микроорганизмов в процессе активного ила. В результате введения в кинетические уравнения процесса активного ила параметра учитывающего физиологическое состояние микроорганизма, уменьшилось количество существенных переменных выступающих в математической модели этого процесса.

PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF MICROORGANISMS IN THE PROCESS OF ACTIVATED SLUDGE

S u m m a r y

The carried out experiments tended towards fixing the dependencies between the determined activity of the dehydrogenases of microorganisms of activated sludge and basic parameters characterizing the process of activated sludge - between substrate loading and the rate of substrate disposal.

The investigations were carried out in model systems with a continuous inflow of substrate. The substrate comprised both pure organic compounds (phenol or glucose) enriched by indispensable inorganic compounds of nitrogen and phosphorus and also real discard waters from organic synthesis industry.

Making use of phase diagram which took into consideration the chronology concerning the change of activity of the dehydrogenases of microorganisms according to the technological parameters of the process of activated sludge, it was possible to isolate graphically the particular stages of biodegradational process. It was the stage of the adaption of microorganisms, the stage of dynamical equilibrium, the stage of oversensitiveness of microorganisms and the stage of their decay.

At the stage of dynamical equilibrium the rate of substrate decay V_v was directly proportional to the determined activity of the dehydrogenases of microorganisms A_v. Mathematical equation for this stage of the process had the following form:

$$V_v = a A_v + b$$

The value of the coefficients a and b was dependent on the sensitivity of the applied methodology of determining the activity of dehydrogenases, on the kind of substrate assimilated by microorganisms, on characteristic features of the investigated set of microorganisms of activated sludge as well as on technical parameters of the applied devices.

General activity of microorganisms A_v, takes into consideration both the quantity of standing crop X taking part in the process of biodegradation of microorganisms as well as their specific activity Ax and is defined by the equation

$$A_v = X \cdot A_x$$

After exceeding the determined critical load, the occurrence of the stage of oversensitiveness concerning the cells of microorganisms could often be observed. The length of time of this stage was short and was characterized by the fact that the determined activity of dehydrogenases was much higher than it would result from the measurements concerning the rate of substrate biodegradation. This stage passed quickly and the microorganisms entered the stage of decay in which the determined activity of dehydrogenases decreased to zero.

The carried out investigations confirmed the thesis that suitable worked out analytical methodology of determining the activity of dehydrogenases of microorganisms permits making use of the changes concerning this activity to the description of biodegradation process of organic compounds by mixed populations of microorganisms in the process of activated sludge. As a result of introducing to the kinetic equations of activated sludge process the parameter taking into account physiological state of microorganism, the number of essential variables appearing in mathematical model of this process was subject to decrease.

AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA DROBNOUSTROJÓW W PROCESIE OSADU CZYNNEGO

S t r e s z c z e n i e

Wykonane doświadczenia zmierzały do ustalenia zależności pomiędzy oznaczaną aktywnością dehydrogenaz mikroorganizmów osadu czynnego, a podstawowymi parametrami charakteryzującymi proces osadu czynnego - obciążeniem substratowym oraz szybkością usuwania substratu.

Badania prowadzono w układach modelowych z ciągłym dopływem substratu. Substratem były zarówno czyste związki organiczne (fenol lub glukoza) wzbogacone niezbędnymi nieorganicznymi związkami azotu i fosforu, jak również rzeczywiste wody odpadowe z przemysłu syntezy organicznej (produkcja bezwodnika maleinowego oraz ftalowego).

Wykorzystanie wykresu fazowego, który uwzględniał chronologię zmian aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów - w zależności od parametrów technologicznych procesu osadu czynnego - umożliwiło graficzne wyodrębnienie poszczególnych etapów procesu biodegradacyjnego. Był to etap adaptacji drobnoustrojów, etap równowagi dynamicznej, etap nadwrażliwości mikroorganizmów oraz etap ich zamierania.

W etapie równowagi dynamicznej szybkość zaniku substratu V_v była wprost proporcjonalna do oznaczanej aktywności dehydrogenaz drobnoustrojów A_v. Matematyczne równanie dla tego etapu procesu miało następującą postać:

$$V_v = a A_v + b$$

Wartość współczynników a i b była zależna od czułości stosowanej metodyki oznaczania aktywności dehydrogenaz, rodzaju substratu przyswajanego przez drobnoustroje, swoistych cech badanego zespołu drobnoustrojów osadu czynnego (głównie struktury zooglealnych skupisk) oraz parametrów technicznych stosowanych urządzeń.

Ogólna aktywność drobnoustrojów A_v uwzględnia zarówno wielkość biomasy X uczestniczących w procesie biodegradacji mikroorganizmów, jak również ich aktywność właściwą A_x i określona jest równaniem:

$$A_v = X \cdot A_x$$

Po przekroczeniu określonego obciążenia krytycznego, obserwowano często występowanie etapu nadwrażliwości komórek drobnoustrojów. Czas trwania tego etapu był krótki i charakteryzował się tym, iż oznaczana aktyw-

ność dehydrogenaz była znacznie wyższa, niż wynikałoby to z pomiarów szybkości biodegradacji substratu. Etap ten szybko mijał i drobnoustroje wchodziły w etap zamierania, w którym oznaczana aktywność dehydrogenaz raptownie malała do zera.

Wykonane badania potwierdziły tezę, że odpowiednio opracowana metodyka analityczna oznaczania aktywności dehydrogenaz mikroorganizmów pozwala wykorzystywać zmiany tej aktywności do opisu dynamiki procesu biodegradacji związków organicznych przez mieszane populacje drobnoustrojów w procesie osadu czynnego. Wskutek wprowadzenia do równań kinetyki procesu osadu czynnego parametru uwzględniającego stan fizjologiczny mikroorganizmu, zmniejszeniu uległa liczba istotnych zmiennych występujących w matematycznym modelu tego procesu.

BIBLIOTEKA GŁÓWNA
Politechniki Śląskiej
3355/83/24

WYDAWNICTWA NAUKOWE I DYDAKTYCZNE POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ MOŻNA NABYĆ W NASTĘPUJĄCYCH PLACÓWKACH:

44-100 Gliwice — Księgarnia nr 096, ul. Konstytucji 14 b
44-100 Gliwice — Spółdzielnia Studencka, ul. Wrocławska 4 a
40-950 Katowice — Księgarnia nr 015, ul. Żwirki i Wigury 33
40-096 Katowice — Księgarnia nr 005, ul. 3 Maja 12
41-900 Bytom — Księgarnia nr 048, Pl. Kościuszki 10
41-500 Chorzów — Księgarnia nr 063, ul. Wolności 22
41-300 Dąbrowa Górnicza — Księgarnia nr 081, ul. ZBoWiD-u 2
47-400 Racibórz — Księgarnia nr 148, ul. Odrzańska 1
44-200 Rybnik — Księgarnia nr 162, Rynek 1
41-200 Sosnowiec — Księgarnia nr 181, ul. Zwycięstwa 7
41-800 Zabrze — Księgarnia nr 230, ul. Wolności 288
00-901 Warszawa — Ośrodek Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN — Pałac Kultury i Nauki

Wszystkie wydawnictwa naukowe i dydaktyczne zamawiać można poprzez Składnicę Księgarską w Warszawie, ul. Mazowiecka 9.