

Józef GRABOWSKI¹, Patricia SCULLY², Zdzisław BŁASZCZAK³,
Aleksander SKIBIŃSKI¹, Marek HAŁAS³

¹ Politechnika Poznańska, Instytut Fizyki, 60-965 Poznań, ul. Piotrowo 3

² Liverpool John Moores University, Byrom St. Liverpool, UK L3 3AF

³ Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Instytut Fizyki, 61-614 Poznań, ul. Umultowska 85

CZUJNIK FLUORESCENCJI DLA ZASTOSOWAŃ ŚRODOWISKOWYCH

Streszczenie. W pracy zaprezentowano oryginalny czujnik fluorescencji do pomiarów środowiskowych. Charakteryzuje go stosunkowo prosta i nowoczesna konstrukcja. Wstępne pomiary wskazują na jego użyteczność w wyznaczeniu stałej dyfuzji rzeki, toksyczności związków chemicznych (sole metali ciężkich) i próbek technologicznych (ekstrakt wodny pyłu lotnego) oraz do pomiarów „on line” toksyczności ścieków miejskich.

FLUORESCENCE SENSOR FOR ENVIRONMENTAL APPLICATIONS

Summary. Fluorescence measurements have numerous applications for environmental monitoring. A fluorescence sensor is presented, which is simple, sensitive and reliable. Applications include wastewater purification (optimization of biodegradation process by toxicity monitoring of both influent and effluent waters, river pollution modeling and toxicity measurements (fly ashes from a central heating plant, and heavy metals).

WSTĘP

Techniki fluorescencyjne znajdują dziś liczne zastosowania w ochronie środowiska. Mimo to wciąż brak względnie prostego i wiarygodnego czujnika fluorescencji, który mógłby być wykorzystywany do pomiarów w środowisku przyrodniczym lub na „linii technologicznej” w zakładzie produkcyjnym.

W niniejszej pracy proponujemy czujnik do pomiaru fluorescencji, który wydaje się spełniać powyższe wymagania. Wskazujemy też na jego możliwe zastosowania w takich problemach środowiskowych, jak: gospodarka stanem sanitarnym rzeki (wykorzystanie do modelu operacyjnego rzeki), badanie toksyczności pierwiastków (np. metali ciężkich) i związków chemicznych, oraz odpadów technologicznych (np. pyłu lotnego wyłapanego przez cyklony) oraz na szczególną przydatność w procesie biodegradacji zanieczyszczeń organicznych ścieków miejskich.

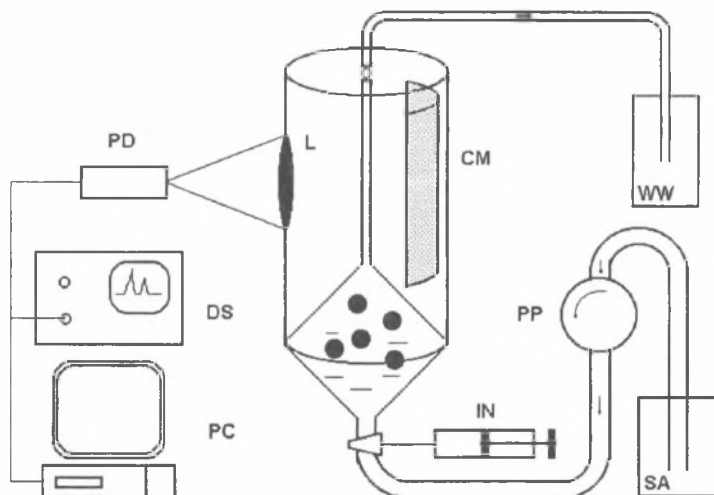
KONSTRUKCJA I ZASADA DZIAŁANIA CZUJNIKA FLUORESCENCJI

Schemat czujnika przedstawia rysunek 1. Jak widać z rysunku, prezentowany czujnik charakteryzuje się oryginalną konstrukcją. Zasadniczą częścią sensora jest szklany reaktor chemiczny. Jego objętość można regulować, w zależności od potrzeby (dla zapewnienia odpowiedniego czasu retencji), w zakresie 20 – 200 ml. Przepływ próbki przez czujnik jest wymuszany pompką perystaltyczną Masterflex, która oprócz wysokiej precyzji, daje możliwość bardzo wolnego pompowania: minimalny strumień około 1 ml/min. Dzięki temu uzyskiwany czas retencji może być dostatecznie długi i tym samym wystarczający (w zakresie: 1-30 minut) na zajście reakcji chemicznej w reaktorze.

W pomiarach toksyczności reagentem jest dwuocian fluoresceiny (FDA), a biosensorem immobilizowane mikroorganizmy (drażetki algininowe komórek glonów lub bakterii). Molekuły FDA, jako niepolarne, łatwo wnikają do wnętrza komórek, gdzie ulegają przemianie w wyniku działania wewnątrzkomórkowego enzymu esterazy, do fluoresceiny. Szybkość tej reakcji jest tym mniejsza, im większa jest toksyczność roztworu.

Fluoresceina jest dobrze znanym, ze swej wydajnej fluorescencji, barwnikiem. Wystarczy więc mierzyć szybkość narastania natężenia fluorescencji uwolnionej wewnątrzkomórkowo fluoresceiny, aby mieć orientację o toksyczności substancji zawartych w próbce wody. Obserwowany sygnał łatwo przeliczyć na wielkości stosowane przez specjalistów od toksyczności.

Układ detekcji sensora jest prosty i nowoczesny. Źródłem światła wzbudzającego są dwie folie elektroluminescujące (z przodu i z tyłu – niewidoczne na schemacie), których światło o odpowiedniej długości pada na rurkę z przepływającym roztworem. Światło fluorescencji jest zbierane przez cylindryczne zwierciadło i następnie skupiane soczewką, na fotodiodzie.



Rys. 1. Schemat czujnika fluorescencji: PC – komputer, DS – oscyloskop, PD – fotodioda, L – soczewka skupiająca, CM – zwierciadło cylindryczne, IN – strzykawka, PP – pompka perystaltyczna S.A. – próbka, WW – zbiornik odpadów

Fig. 1. Schematic of the fluorescence sensor: PC – computer, DS – oscilloscope, PD – photodiode, L – lens, CM – cylindrical mirror, IN – injection syringe, PP – peristaltic pump, S.A. – sample, WW – waste container

MODEL OPERACYJNY RZEKI

Dyspersję zanieczyszczeń konserwatywnych (nie wchodzących w reakcje chemiczne) w rzece traktowanej jako układ jednowymiarowy opisuje równanie różniczkowe zwyczajne drugiego rzędu - tzw. równanie dyfuzji adwekcyjno - konwekcyjnej:

$$D_x \frac{d^2 C}{dx^2} - u \frac{dC}{dx} = 0 \quad (1)$$

gdzie: u – prędkość rzeki; D_x – efektywna stała dyfuzji (charakterystyczna dla każdej rzeki – nawet dla jej poszczególnych odcinków) oraz $C=C(x)$ jest koncentracją zanieczyszczenia w odległości „ x ” od miejsca jej zrzutu do rzeki.

Rozwiązaniem powyższego równania jest:

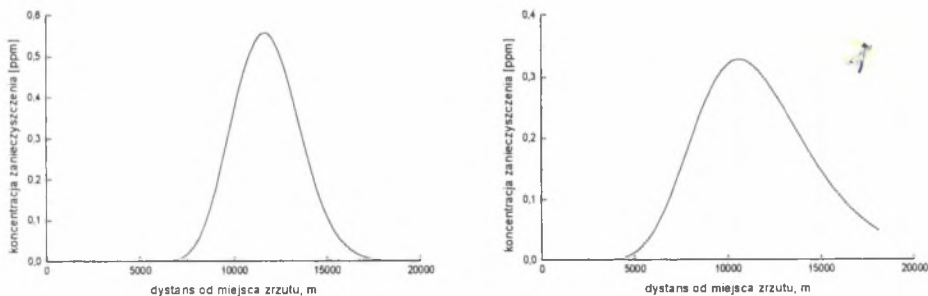
$$C(x,t) = \frac{\frac{m}{A}}{\sqrt{4\pi D_x t}} \exp\left[-\frac{(x-ut)^2}{4D_x t}\right] \quad (2)$$

gdzie: m – ładunek (kg), A – przekrój poprzeczny koryta rzeki (m^2).

Dla warunków:

strumień: 400 m^3/s
 prędkość rzeki: 1 m/s
 $D_x =$ 100 i 500 m^2/s
 ładunek: 1 kg/h
 krok czasu: 0.257 h

otrzymuje się po godzinie następujący (w funkcji odległości od miejsca zrzutu) rozkład koncentracji zanieczyszczenia w rzece:



Rys. 2. Rozkład koncentracji zanieczyszczenia (substancja konserwatywna) po 1 godzinie od zrzutu (dane wejściowe powyżej)

Fig. 2. Distribution of the contaminant concentration along the river length after one hour (input data as given above)

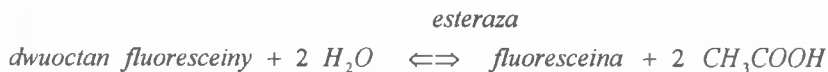
Wyniki rysunku 2 wskazują na to, że rozkład zanieczyszczenia, dla danego ładunku zanieczyszczenia, zależy w dużym stopniu od stałej dyfuzji. Stałą dyfuzji rzeki można wyznaczyć jedynie doświadczalnie (i zawsze jest to efektywna wielkość). Aby to zrobić, należy dokonać inwersji równania (2) i zmierzyć, przynajmniej dla jednej odległości od miejsca zrzutu zanieczyszczenia, koncentrację barwnika w określonej odległości od miejsca zrzutu. Sugerujemy, że fluoresceina, jako związek odporny na procesy utlenienia i redukcji oraz charakteryzujący się wysoką wydajnością fluorescencji, jest związkiem odpowiednim do tego celu. Z obliczeń wynika, że aby wykorzystanie równania (2) dla wyznaczenia stałej dyfuzji rzeki było uzasadnione (np. przy stosunku szerokości rzeki do długości odcinka rzędu 1:10), trzeba dysponować czujnikiem pomiaru natężenia fluorescencji wystarczająco czułym, aby rejestrować koncentracje fluoresceiny rzędu ułamka ppm (parts per million).

Proponowany w pracy czujnik fluorescencji był w stanie rejestrować tak małe koncentracje fluoresceiny, co potwierdza jego przydatność do tworzenia modeli operacyjnych rzek małych i średniej wielkości.

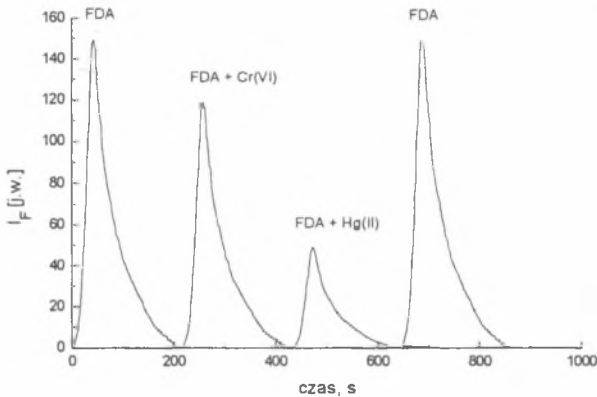
BADANIA TOKSYCZNOŚCI: METALE CIĘŻKIE I PYŁ LOTNY

Badania przeprowadzono dla jonów metali ciężkich: Cr (VI) i Hg(II) oraz pyłu lotnego wytrąconego przez cyklony miejskiej ciepłowni (Poznań – Karolin). Celem pierwszych było porównanie toksyczności rozważanych jonów metali ciężkich, natomiast w drugim przypadku chodziło o danie odpowiedzi na pytanie: Czy pył lotny leżakowany na hałdach zakładowych stanowi zagrożenie dla wód głębinowych (w literaturze opinie są podzielone, chociaż wydaje się przeważać pogląd, że zależy to od konkretnego przypadku, przede wszystkim od pochodzenia węgla i technologii jego spalania)?

Związkiem fluorogennym w obu przypadkach był dwuocian fluoresceiny (FDA), który jest tani i łatwo dostępny. Molekuły FDA, jako molekuły niepolarne, łatwo penetrują błonę mikroorganizmu i następnie w wyniku działania wewnątrzkomórkowego enzymu esterazy (występuje we wszystkich organizmach) generowana jest fluoresceina – patrz poniższy schemat:

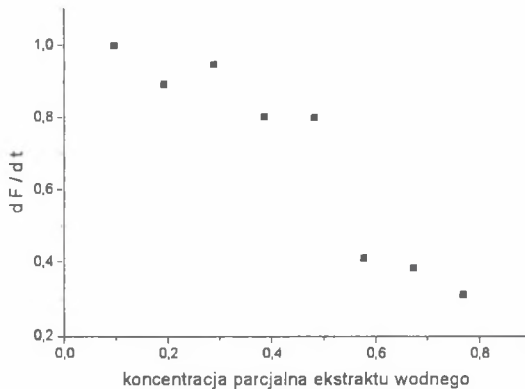


FDA w acetonie (2 mg/ml), przechowywany w lodówce, wstrzykiwano przed reaktorem roztworu wodnego w ilości 50 ul. Testowanymi mikroorganizmami były mikroorganizmy glebowe (gleba pod trawniki). Uzyskane wyniki przedstawiają rysunki 3 i 4.



Rys. 3. Natężenie fluorescencji (jednostki względne) przy długości fali 612 nm dla próbek buforu fosforanowego (0.1 M) z domieszką lub bez metalu jonów metalu ciężkiego (20 ppm)

Fig. 3. Fluorescence intensity at 612 nm (relative units) for samples with FDA or FDA + metal (20 ppm) in phosphate buffer solution



Rys. 4. Wpływ zawartości ekstraktu wodnego z pyłu lotnego w próbce: bufor fosforanowy (0.1 M., pH = 7.0) na względną szybkość wzrostu natężenia fluorescencji

Fig. 4. The effect of an increased contamination of phosphorescence buffer (0.1 M., pH = 7.0) with water extract from fly ash on fluorescence intensity rate

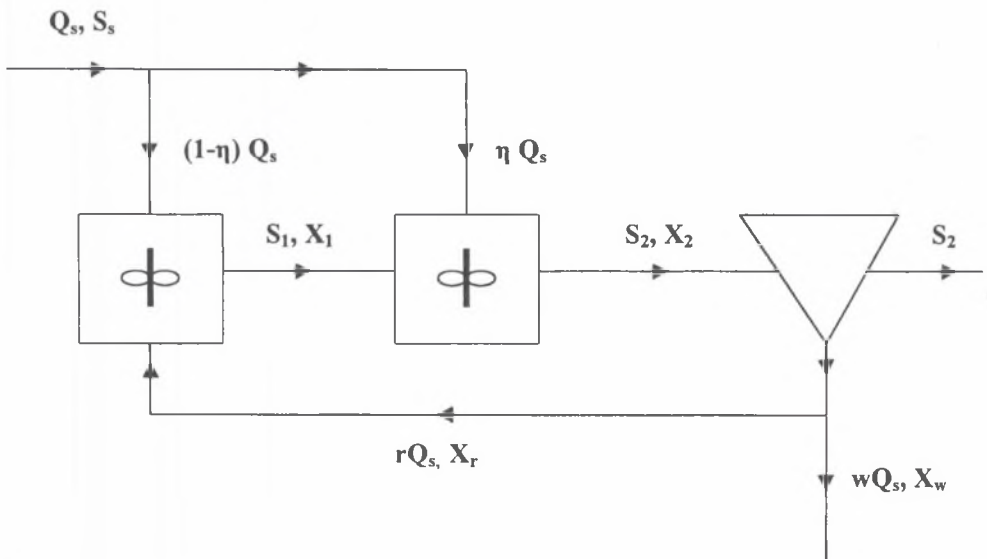
Jak widać z rysunku 3, toksyczność jonów rtęci jest większa od toksyczności jonów chromu (niemal dwukrotnie).

Ekstrakt z popiołu lotnego uzyskiwano poprzez zalanie popiołu wodą destylowaną w proporcji 1:1 i pozostawienie na okres 1 miesiąca. Uzyskane wyniki (rys. 4) nie pozostawiają żadnych wątpliwości, że badany pył jest toksyczny. Stąd wniosek, że nie powinien on być

pozostawiany samemu sobie (jak to jest w przypadku hańd), lecz unieszkodliwiany (np. zabezpieczany w wyrobiskach po glinie lub w wolnych chodnikach kopalnianych).

BIODEGRADACJA ZANIECZYSZCZEŃ ORGANICZNYCH ŚCIEKÓW

Wydaje się, że szczególnie pożądane jest zastosowanie prezentowanego czujnika fluorescencji do monitorowania toksyczności ścieków zarówno surowych (po oczyszczeniu mechanicznym) oraz ścieków oczyszczonych (w celu kontroli jakości oczyszczania). Pokażemy, że pomiar toksyczności wpływających do oczyszczalni jest podstawowy dla celów optymalizacji biodegradacji zanieczyszczeń organicznych. Do rozważań weźmiemy układ technologiczny szczególnie podatny na sterowanie i optymalizację, tj. układ, w którym komorę z osadem czynnym stanowią dwa jednakowe pracujące w szeregu zbiorniki (patrz rys. 5).



Rys. 5. Biodegradacja zanieczyszczeń organicznych metodą osadu czynnego z reaktorem dwukomorowym
Fig. 5. Biodegradation of sewage organic contaminants in a two-container reactor tank

Przedstawiony powyżej układ technologiczny (w stosunku do najczęściej stosowanego jednokomorowego) zawiera dodatkowy parametr operacyjny, jakim jest η współczynnik rozdziału ścieków surowych pomiędzy obie komory (oprócz tradycyjnych parametrów operacyjnych: r – współczynnik strumienia recykulowanego oraz w – współczynnik strumienia osadu nadmiernego). Dla warunków stacjonarnych można napisać:

$$\begin{cases} 0 = D_1 X_{01} + \mu X_1 - D_1 X_1 \\ 0 = D_1 S_{01} - \frac{\mu}{Y} X_1 - D_1 S_1 \end{cases} \quad \begin{cases} 0 = D_2 X_{02} + \mu X_2 - D_2 X_2 \\ 0 = D_2 S_{02} - \frac{\mu}{Y} X_2 - D_2 S_2 \end{cases} \quad (3)$$

gdzie

$$\begin{aligned}
 D_1 &= \frac{(1-\eta+r)Q_s}{V_{k1}} & D_2 &= \frac{(1+r)Q_s}{V_{k2}} \\
 S_{01} &= \frac{1-\eta}{1-\eta+r} S_s & S_{02} &= \frac{(1-\eta+r)S_1 + \eta S_s}{1+r} \\
 X_{01} &= \frac{r}{1-\eta+r} X_r & X_{02} &= \frac{1-\eta}{1+\eta+r} X_1
 \end{aligned} \tag{4}$$

Używane powyżej symbole oznaczają:

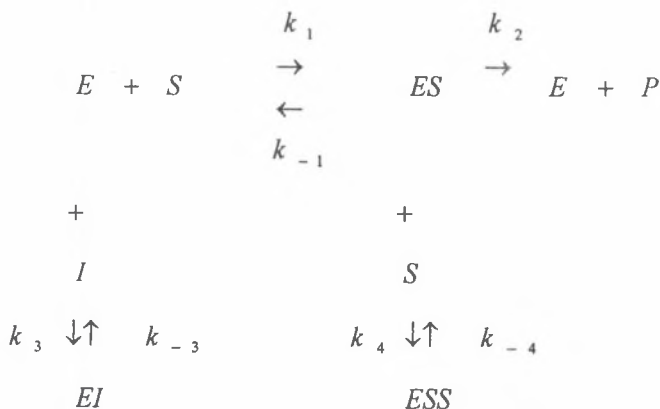
- D_1, D_2 - szybkości rozcieńczania dla komór I i II (odwrotność czasu retencji),
 S_1, S_2 - koncentracja substratu (zanieczyszczeń organicznych) w komorach I i II,
 X_1, X_2 - koncentracja biomasy (osad czynny) w komorach I i II,
 μ - względna szybkość wzrostu bakterii,
 Y - współczynnik ekonomiczny (wydajność konwersji substancji organicznej w biomasę),
 η - współczynnik rozdziału ścieków surowych pomiędzy obie komory.

Rozwiązując pierwszy z układów równań (3), uzyskuje się S_1 oraz X_1 , po czym (po wstawieniu tych wartości jako S_{02} i X_{02} do drugiego z układów (3)), otrzymuje się ostatecznie: S_2 oraz X_2 .

W układach równań (3) występuje względna szybkość wzrostu biocenozy osadu μ (biodegradacja zależy przede wszystkim od jej wartości). Krótko mówiąc, taka jest biodegradacja, jaki jest względny wzrost biocenozy osadu czynnego.

Względny wzrost zależy od rodzaju mikroorganizmu oraz zasobności ośrodka w substancje pożywkowe i warunki wzrostu (np. temperatura). Oczywiście, ze względu na to, że wzrost mikroorganizmów (przyrost biomasy) można traktować jako wynik reakcji enzymatycznych, szybkość wzrostu (a tym samym i biodegradacji) zależy od substancji toksycznych hamujących enzymatyczne przetwarzanie substratu na biomasę.

Chociaż proces wzrostu biomasy jest z pewnością procesem złożonym (skoro nawet pojedyncza komórka zaopatrzona jest w kilka tysięcy różnych enzymów), okazuje się, że ogólny efekt jest bardzo zbliżony do reakcji enzymatycznej z „jednym substratem i jednym enzymem”. W pracy przyjęto, że mamy do czynienia jedynie z „dwoma komplikacjami”: inhibicja inhibitorem oraz inhibicja substratem. W tym przypadku, w którym inhibitor konkuruje z substratem o miejsce na enzymie oraz występujący w nadmiarze substrat może produkować nieaktywny kompleks substrat – enzym substrat, ogólną enzymatyczną reakcję wzrostu można zapisać:



gdzie:

$k_1, k_2, k_3,$ oraz k_4 są stałymi szybkości odpowiednich reakcji.

Analiza powyższych reakcji prowadzi do wzoru na ogólną względną szybkość wzrostu:

$$\mu = \frac{\mu_m [S]}{K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_D} \right) + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}} \quad (5)$$

gdzie:

$$K_S = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

$$K_D = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

$$K_I = \frac{k_{-3}}{k_4}$$

oraz gdzie:

$$K_M = K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_D} \right)$$

Zależność (5) w przypadku braku inhibicji substratem ($K_I = \infty$) przybiera postać:

$$\mu = \frac{\mu_m [S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

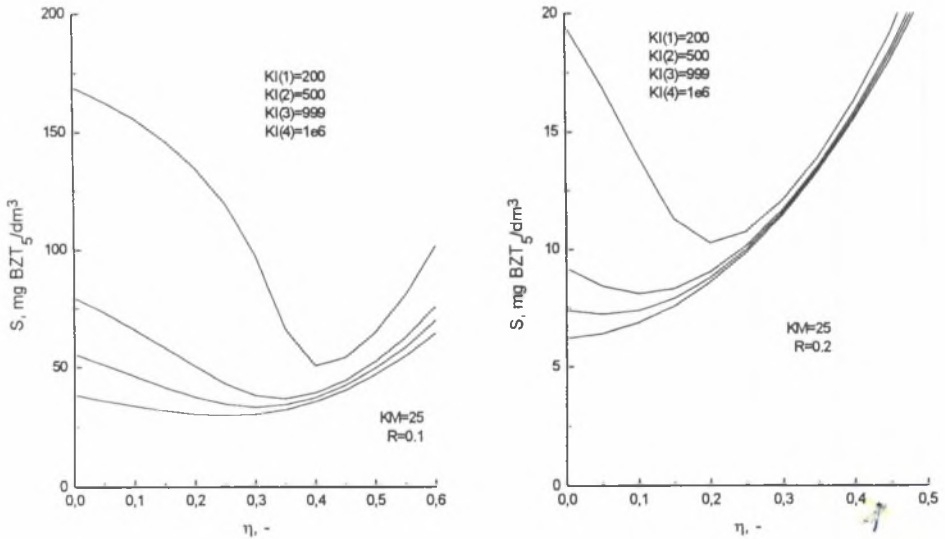
znaną jako zależność Monoda [3].

Prezentowany w pracy sensor pozwala oszacować w sposób eksperymentalny (pośredni, bez konieczności pomiaru biomasy; co jest żmudnym pomiarem) względną szybkość wzrostu μ , przez porównanie natężenia fluorescencji w warunkach „bez” oraz w „przypadku inhibicji”. Wówczas mamy:

$$\mu = \frac{\mu_0 - \mu_I}{\mu_0} = 1 - \frac{\mu_I}{\mu_0} = 1 - \frac{F_I}{F_0} \quad (7)$$

gdzie, oczywiście, F_I oraz F_0 są szybkościami wzrostu natężeniami fluorescencji w warunkach „inhibicji” i w warunkach „bez inhibicji”.

Z zależności (5) poprzez symulację komputerową uzyskano następujące zależności wpływu jakości ścieków (stałe reakcji) oraz wartości współczynnika rozdziału ścieków surowych na obie komory, na koncentrację końcową zanieczyszczeń.

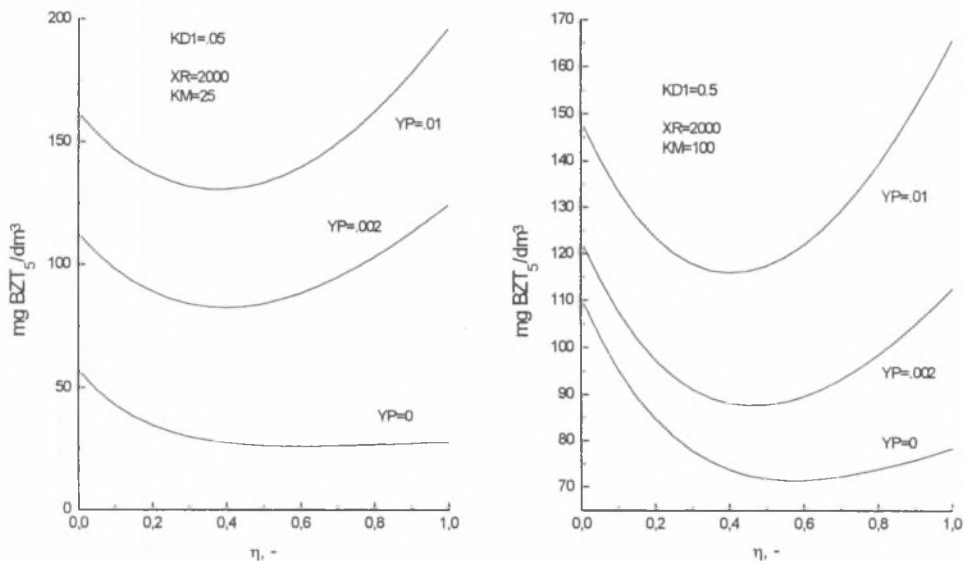


Rys. 6. Wpływ współczynnika rozdziału ścieków surowych na oba zbiorniki z osadem czynnym na koncentrację zanieczyszczeń (wyrażona jako BZT₅) w ściekach oczyszczonych

Fig. 6. The effect of η (coefficient of distribution of influent sewage flux between both containers) on contaminant concentration (in BOD₅ - Biological Oxygen Demand) in effluent (purified sewage flux). Case of competitive inhibition

Z krzywych przedstawionych na powyższym rysunku widać, że w każdym przypadku istnieje minimum (optymalnie niska koncentracja zanieczyszczeń ścieków oczyszczonych). Aby uzyskać to minimum, trzeba wiedzieć, na ile toksyczne są wpływające ścieki – co z kolei pozwala na optymalny dobór wartości współczynnika η .

W przypadku inhibicji substratem otrzymuje się poniższe krzywe (rys. 7):



Rys. 7. Wpływ jakości ścieków (stałe reakcji) oraz wartości współczynnika rozdziału ścieków surowych pomiędzy obie komory na koncentracje zanieczyszczenia (w jednostkach BZT₅) w ściekach oczyszczonych

Fig. 7. The effect of η (coefficient of distribution of influent sewage flux between both containers) on contaminant concentration (in BOD₅ - Biological Oxygen Demand) in effluent (purified sewage flux). Case of uncompatitive (with substrate) inhibition

WNIOSKI

Prezentowany czujnik fluorescencji jest oryginalny. Wyróżnia się on nowoczesną konstrukcją: źródłem światła wzbudzającego są 2 folie elektrooluminescujące, detektorem światła fluorescencji jest fotodioda, stosunkowo długi czas retencji próbki (1-30 minut) przy małej objętości (1-200 ml) reaktora chemicznego.

Czujnik charakteryzuje się wysoką czułością pomiaru natężenia fluorescencji: rzędu ułamka części na milion (ppm), co czyni go użytecznym w pomiarach eksperymentalnych współczynnika dyfuzji rzeki średniego rozmiaru (szerokość do 200 m).

Istotną zaletą czujnika jest możliwość pomiaru toksyczności, zarówno związków chemicznych (np. sole metali ciężkich), jak i próbek technologicznych (pył lotny z elektrociepłowni). Stosunkowo długi czas retencji (przy małej objętości reaktora chemicznego) pozwala na zastosowanie czujnika do pomiarów „on line”; w szczególności dla monitoringu toksyczności ścieków surowych oraz oczyszczonych – co pozwala na sterowanie pracą oczyszczalni ścieków.

LITERATURA

1. Tzanos Constantine P.: „Central Difference-Like Approximation for the Solution of the Convection – Diffusion Equation”; Numerical Heat Transfer, Part B, vol. 17, pp. 97-112, 1990.
2. Szymkiewicz R.: „Solution of the advection – diffusion equation using the spline function and finite elements”; Communications in Numerical Methods in Engineering”, vol 9, pp. 197-206, 1993.
3. Monod J.: The growth of bacterial cultures”; in: Annual Review of Microbiology, Ed. Charles E. Clifton, Annual Reviews, Inc., vol. III, Stanford (California, USA), 1949.
4. Grady C.P.L. and Lim H.C.: „Biological waste water treatment – theory and applications”; Marcel Dekker, Inc., New York and Basel 1997.
5. Yost K.J., Wuksch R. F., Adams T.G. and Michalczyk B.: „Heavy metal sources and flows in a municipal sewage system: Literature Survey and Field Investigation of the Komo, Indiana, Sewage System”; EPA Project Summary, EPA – 600/52-81-224 (1981).
6. Piszkiwicz D.: „Kinetics of chemical and enzyme – catalyzed reactions”; Oxford University Press, New York 1987.
7. Beaubien A., Jolicoeur C.: „The toxicity of various heavy metal salts, alcohols and surfactants to microorganisms in a biodegradation process: a flow microcalorimetry investigation” ; in Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, EDS. Dickson Liu, Dudka B.J., Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, pp. 433-444, 1984.
8. Hjelmar O., Hansen E.A., Larsen F. And Thomassen H.: „Leaching and soil/groundwater transport of contaminants from coal combustion residues; Water Quality Institute, Research Centre, 11 Agern Alle, DK –2970 Horsholm (Denmark) – Final Report, 1991.
9. Grabowski J., Baker P., Latosińska R., Scully P. and Edwards R.: A rationale for using a fibre optic toxicity sensor in the automatic control of a sewage treatment plant – some measurements of the inhibition effects of metal contaminants in Sensors and their Applications VII, Institute of Physics Publishing, Bristol and Philadelphia, pp. 319-323, 1995.

Abstract

Fluorescence based technology has found numerous applications in the field of environmental protection. Fluorescence techniques can be much sophisticated, but for environmental purposes should provide a possibility of measurements in a natural system. Therefore, the fluorescence sensor designated for these purposes should be relatively simple, sufficiently sensitive and highly reliable.

The construction of the flow fluorescence sensor is new and original a novel one. Its main elements are: a chemical reactor and an optical system (for fluorescence intensity measurement).

The fluorescence excitation light is emitted by two electroluminescent foils and focused on a capillary pipe through which the pigment water solution flows. The emitted fluorescence is collected by a cylindrical mirror and then focused on a photodiode and the generated voltage is then amplified and measured. The flow of a sample through the sensor is induced by a peristaltic pump. The rate flow is about 2 ml per minute. With a volume of the chemical reactor of about 5 ml, the retention time is slightly over 2 minutes.

In measurements of toxicity, a few alginine beads with immobilized microorganisms (algae, activated sludge, soil bacteria or any other) are placed in the reactor. Then a small dose of FDA (fluorescein diacetate) in acetone is injected at the entrance to the reactor. The FDA molecules penetrate microorganism cell membranes and are then converted by intracellular esterase into fluorescein. The rate of this process is proportional to the rate of fluorescence intensity (which can be easily determined) and depends on toxic contaminants.

The presented fluorescence sensor is able to register fluorescence intensity from fluorescein one can expect in a river about 10 km downstream (with a river of 200 m wide and with a pigment dose of about 1 kg). Such a sensitivity is high enough to allow one a determination of an effective diffusion constant which is a characteristic one for each river, of which one has to know for being able to elaborate a river operational model. Additionally, the sensor can be used in measuring river water toxicity in several places, which then allows one to evaluate an ability of the river to self purification.

In the paper we propose a sensor which could work in procedures related to waste water purification (optimization of biodegradation process implied by the toxicity monitoring of both influent and effluent waters [1], [2]), river pollution modeling (an operational model of a given river) and toxicity measurements (in the paper we present results for fly ashes from a central heating plant, and a few metals: copper, chromium and mercury).

Praca wykonana w ramach programu BW 62-180 Politechniki Poznańskiej

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Korneliusz Miksch