ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252628

(11) (B1)

(51) Int. Cl.[4]
C 02 F 3/02

(22) Přihlášeno 21 04 86
(21) PV 2874-86

(40) Zveřejněno 12 02 87

(45) Vydáno 16 05 88

(75)
Autor vynálezu

MAIXNER JIŘÍ ing., ČIŽINSKÁ SIMONA ing., BARTA JIŘÍ ing., VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV, PRAHA

(54) Způsob provedení disimilační denitrifikace vod buněčnými agregáty

Způsob provedení disimilační denitrifikace vod buněčnými agregáty s denitrifikační aktivitou je vyznačený tím, že vody obsahující dusičnany a/nebo dusitany v rozmezí koncentrací 0,001 mg.litr^{-1} až 2 000 mg.litr^{-1}, se uvádí ve styk s imobilizovanými buněčnými agregáty v aerobním prostředí, při koncentraci kyslíku 0,2 mg.litr^{-1} až do maximální saturace vod kyslíkem.

Vynález se týká způsobu provedení disimilační denitrifikace vod buněčnými agregáty při nulové až maximální saturaci vod kyslíkem.

Pro průběh enzymové disimilační denitrifikace je nezbytná přítomnost příslušných denitrifikačních mikroorganismů, velmi nízká hladina rozpuštěného kyslíku, vysoká hladina vhodného donoru elektronu a dostatečný transport živin.

V disimilačním procesu organismy využívají dusičnany resp. dusitany jako akceptoru elektronů místo molekulárního kyslíku v jeho nepřítomnosti (Painter, H. A.: A Review of Literature of Inorganic Metabolism in Microorganism, Water Res., 4, 293-450, 1970). Vlastní mechanismus redukce dusičnanů až na molekulární dusík je katalyzován čtyřmi enzymy - nitrátreduktázou, nitritreduktázou, NO-reduktázou a N_2O-reduktázou.

Nejlépe prostudovaným enzymem, který se účastní tohoto procesu je nitrátreduktáza, jejíž aktivní místo je lokalizováno na vnitřní straně cytoplazmatické membrány (John, P.: Aerobic and Anaerobic Bacterial Respiration Monitored by Electrodes, J. Gen. Microbiol. 98, 231-238, 1977; Kristjanson, J. K., Walter, B., Hollocher, T.: Respiration - Dependent Proton Trannslocarion and the Transport of Nitrate and Nitrite in Paracoccus denitrificans and Other Denitrifying Bacteria, Biochemistry 17, 5014-5019, 1978).

Podmínkou syntézy nitrátreduktázy je kromě přítomnosti induktoru, tj. dusičnanu, nepřítomnost rozpuštěného kyslíku. Kyslík reprimuje syntézu respirační nitrátreduktázy i v přítomnosti induktoru a zároveň inhibuje aktivitu nitrátreduktázového systému již předem vytvořeného v buňkách, tj. dochází ke kyslíkovému efektu (represe biosyntézy a inhibice enzymů).

Nitritreduktáza je enzym solubilní, lokalizovaný pravděpodobně v periplazmatickém prostoru (Alefounder, P. R., Ferguson, S. J.: The Location of Dissimilatory Nitrite Reductase and the Control of fissimilatory Nitrate Reductase by Oxygen in Paracoccus denitrificans, Biochem. J. 192, 231-240, 1980).

NO-reduktáza a N_2O-reduktáza jsou enzymy membránově vázané. Jak vyplývá z povahy denitrifikačních mikroorganismů je molekulární kyslík při denitrifikaci v suspenzní kultuře využíván přednostně jako akceptor elektronů a tím blokuje nitrátovou respiraci. Proto je nutné pro disimilační dinitrifikaci zachovat anoxické podmínky, tj. nízkou koncentraci rozpuštěného kyslíku. Focht a Chang, (Focht, D. D. a Chang, A. C.: Nitrifikation and Denitrifikation Processes Related to Waste Water Treatment. Adv. Appl. Microbiol. 19, 153-186, 1975) uvádějí jako kritickou koncentraci rozpuštěného kyslíku pro denitrifikaci 6 až 63 $\mu mol.l^{-1}$. Najakima et al. (Najakima, M., Hayamizu, T., and Nishimura, H.: Inhibitory Effect of Oxygen on Denitrification in Sludge from an Oxidation Ditch. Water Res. 18, 339-343, 1984) zjistili, že v suspenzních kulturách probíhá dinitrifikace do koncetrace rozpuštěného kyslíku 15 $\mu mol.l^{-1}$.

Otázka inhibice disimilační denitrifikace kyslíkem však není jednoznačná, neboť denitrifikační mikroorganismy mají ve svém elektron transportním systému hem, pro jehož syntézu je kyslík nezbytný.

Strand et al. (Strand, S. E., McDonnell, A. J., and Unz, R. F.: Concurrent Denitrification and Oxygen Uptake in Microbial Films. Water Res. 19, 335-344, 1985) sledovali průběh denitrifikace v mikrobiálních filmech s aerobním povrchem. Zjistili, že koncentrace rozpuštěného kyslíku 0,1 až 14,0 $mg.l^{-1}$ (3,1 až 437,5 $\mu mol.l^{-1}$) na fluidní vrstvě má bezvýznamný vliv na dinitrifikační rychlost v mikrobiálním filmu, přičemž závisí na tloušťce filmu.

Pro uskutečnění biochemické redukce dusičnanu je nezbytná přítomnost zdroje organického uhlíku.

St. Amant a McCarty (St. Amant, P. P., McCarty, P. L.: Treatment of High Nitrate Water. J. Am. Wat. Wks. Assn. 61, 659-662, 1969) upozorňují na zvýšenou spotřebu organického zdroje uhlíku v přítomnosti rozpuštěného kyslíku.

Jsou známy způsoby výroby imobilizovaných buněčných biokatalyzátorů na bázi buněčných agregátů s různými enzymovými aktivitami. Buněčné katalyzátory a způsob jejich výroby jsou předmětem čs. autroského osvědčení č. 231 458. Vypracovali jsme specifický způsob zpěvňování částic imobilizovaných buněk s detrifikační aktivitou, který je předmětem čs. autorského osvědčení č. 245 584. Tyto zpěvněné částice imobilizovaných buněk na bázi buněčných agregátů umožňují denitrifikaci vod s vysokou účinností. Základní vlastnosti částic buněčných agregátů byly popsány v Biotechnol. Letters, 10 737-742, 1985.

Zjistili jsme, že vlastnosti buněčného biokatalyzátoru dovolují vést denitrifikační proces i při vysokých koncentracích rozpouštěného kyslíku, což umožňuje provádět nitrátovou disimilaci z nitrátu až na plynný dusík a aerobních podmínkách. Tím je rovněž do značné míry predikována technologická schůdnost procesu enzymové dinitrifikace vod.

Porušení integrity plazmatické membrány navozené způsobem imobilizace a zpevňování částic způsobí, že i v přítomnosti kyslíku je odbouráván dusičnan, resp. nitrit stejnou specifickou rychlostí. Je to zřejmě způsobeno tím, že následkem zrušení membránového potenciálu pronikají nitrity do buněk, kde inhibují terminální oxidázy, jejichž aktivní centra se nalézají na vnitřní straně cytoplasmatické membrány.

Možnost využití imobilizovaných buněk s denitrifikační aktivitou i v aerobním prostředí vede k úsporám nákladů a energie na odkysličování upravované vody a následnou reaeraci, neboť pitná voda pro hromadné zásobování musí obsahovat minimálně 50% nasycení kyslíkem. Zároveň je zbráněno průběhu anaerobních pochodů, které jsou provázeny tvorbou zapáchajících látek.

Podstatou řešení podle předmětného vynálezu je způsob provedení disimilační denitrifikace vod buněčnými agregáty s denitrifikační aktivitou, které je vyznačeno tím, že vody obsahující dusičnany a/nebo dusitany v rozmezí koncentrací 0,001 $mg.litr^{-1}$ až 2 000 $mg.litr^{-1}$, se uvádí ve styk s imobilizovanými buněčnými agregáty při koncentraci rozpuštěného kyslíku 0,2 $mg.litr^{-1}$ až maximální saturaci vod kyslíkem.

Pro enzymovou denitrifikaci vod pomocí imobilizovaných zpevněných částic buněčných agregátů byly použity různé typy vod obsahující různé koncentrace dusičnanů a/nebo dusitanů, např. voda povrchová, podzemní a odpadní.

K analytickému hodnocení biochemických aktivit bylo použito následujících a takto definovaných veličin:

$$v_{NO_3^-} = \text{specifická denitrifikační rychlost} = \frac{\text{poč. konc. } NO_3^- - \text{zbytková konc. } NO_3^-}{\text{navážka suché hmoty katalyzátoru.čas}} \quad (mg.g^{-1}.h^{-1})$$

NO_3^-	koncentrace dusičnanových iontů	$mg.l^{-1}$
NO_2^-	koncentrace dusitanových iontů	$mg.l^{-1}$
$CHSK_{MN}$	chemická spotřeba kyslíku	$mg.l^{-1}$
X	sušina vzorku	% hmot.
$k/O_2/$	koncentrace rozpuštěného kyslíku	$mg.l^{-1}$

K stanovení dusičnanů a dusitanů bylo použito spektrofotometrických metod, v prvém případě reakci se salicylanem sodným, v druhém případě s kyselinou sulfanilovou a N-/1--naftyl/-etylendiaminhydrochloridem. Chemická spotřeba kyslíku /$CHSK_{Mn}$/ byla zjišťována titrační Kubelovou metodou. Sušina vzorku byla stanovena gravimetricky sušením vzorku při 105 °C.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku byla zjišťována jodometrickou metodou v Alsterbergově modifikaci. Obsah rozpuštěného kyslíku v % hmot. nasycení roztoku byl vypočten použitím tabelových hodnot rovnovážných koncentrací kyslíku pro dané teploty. Uvedená měření byla prováděna podle doporučených metod Horákovu (Horáková a kol.: Metody chemické analýzy vod, scriptum VŠCHT, Praha 1981).

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

P ř í k l a d 1

Pro denitrifikaci vod byl použit biokatalyzátor, jehož způsob přípravy je popsán v čs. autorském osvědčení č. 231 458 a způsob zpevňování částic v čs. autorském osvědčení č. 245 584. Jako výchozího materiálu byla pro imobilizaci a zpevňování použita směsná kultura aktivovaného kalu.

50 g skladovaného biokatalyzátoru v 0,5 % hmot. etanolu bylo důkladně promyto destilovanou vodou a rozděleno na dva stejné díly. Prvních 25 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 30,3 % hmot. bylo suspendováno v 500 ml destilované vody, obsahující dusičnan sodný o koncentraci 95,8 $mg.l^{-1}$ NO_3^- a glukózu o koncentraci 101,5 $mg.l^{-1}$. Suspenze byla v 1 000 ml Erlemayerově baňce kontinuálně míchána na elektromagnetickém míchadle (frekvence otáček 120 za min^{-1}) po dobu 60 minut.

Vzorek byl v průběhu testu provzdušňován stlačeným vzduchem a koncentrace kyslíku v suspenzi byla udržována při teplotě 21,5 °C na koncentraci 7,96 $mg.l^{-1}$, což odpovídá 91,0 % hmot. nasycení kyslíkem. Denitrifikace probíhala při teplotě 21,5 °C a pH 7,2.

Druhých 25 g vlhké hmoty biokatalyzátoru bylo použito pro kontrolní test za anoxických podmínek. Destilovaná voda byla převařena za účelem odstranění rozpuštěného kyslíku a po ochlazení na 21,5 °C byl přidán dusičnan sodný v koncentraci 95,8 $mg.l^{-1}$ NO_3^- a glukóza v koncentraci 101,5 $mg.l^{-1}$.

Test probíhal za stejných shora definovaných podmínek, avšak bez provzdušňování, a hrdlo Erlemayerovy baňky bylo neprodyšně uzavřeno fólií z plastické hmoty pro zachování anoxických podmínek. Koncentrace rozpuštěného kyslíku činila při 21,5 °C 1,43 $mg.l^{-1}$, což odpovídá 16,3 % hmot. nasycení suspenze kyslíkem.

V průběhu 60 minut byly odebírány vzorky, ve kterých byly zjišťovány aktuální koncentrace dusičnanů a dusitanů, organického uhlíku, vyjádřeného hodnotou $CHSK_{Mn}$ a rozpuštěného kyslíku. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1, kde je uvedena i výsledná specifická denitrifikační rychlost $v_{NO_3^-}$.

Z uvedených výsledků vyplývá, že se specifická denitrifikační rychlost nemění ani při 91 % hmot. nasycení kyslíkem. Hodnoty $CHSK_{Mn}$ ukazují, že organický uhlík, tj. glukóza se spotřebovává přibližně v množství odpovídajícím stechiometrickému poměru, který vyplývá z rovnice:

$$NO_3^- + 0{,}208\ C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 0{,}5\ N_2 + 1{,}25\ CO_2 + 0{,}75\ H_2O + OH^-$$

Mírné zvýšení přítomného organického uhlíku ($CHSK_{Mn}$) lze přisuzovat mechanickému narušení agregátů mícháním organických látek do roztoku.

Tabulka 1

Čas min.	Aerobní podmínky				Anoxické podmínky			
	NO_3^- mg.l^{-1}	NO_2^- mg.l^{-1}	$CHSK_{Mn}$ mg.l^{-1}	$k/O_2/$ mg.l^{-1}	NO_3^- mg.l^{-1}	NO_2^- mg.l^{-1}	$CHSK_{Mn}$ mg.l^{-1}	$k/O_2/$ mg.l^{-1}
0	95,8	0	101,5	7,96	95,8	0	101,5	1,43
10	30,2	0	65,8	7,98	29,5	0	68,1	1,41
30	16,7	0	62,5	7,95	16,9	0	64,2	1,35
60	17,2	0	64,0	7,96	16,8	0	666,7	1,30
$v_{NO_3^-}$ mg.g^{-1}.h^{-1}		5,19				5,21		

Příklad 2

Na úpravě vody se zpracovává povrchová voda k přípravě pitné vody v množství 20 l.s^{-1}. Přiváděná upravovaná voda je zaváděna přes systém česlí do usazovací nádrže, která slouží k sedimentaci nerozpuštěných látek.

Voda přitékající z usazovací nádrže na denitrifikační jednotku v průměru obsahovala:

NO_3^-	80,0 mg.l^{-1}
$CHSK_{Mn}$	5,0 mg.l^{-1}
pH	7,05
teplota	12,5 °C
nasycení kyslíkem	70 % hmot. (7,43 mg.l$^{-1}O_2$ při 12,5 °C)

V nátokové sekci na denitrifikační jednotku je umístěn statický směšovač, do kterého je dávkován 10 % hmot. etanol, jako zdroj organického uhlíku, v množství 30 mg.l^{-1}.

Denitrifikační jednotka je složena z 5 pater. Upravená voda je přiváděna na horní stupeň a odtud kaskádovým tokem protéká všemi pěti patry. Každé patro obsahuje 1 500 kg biokatalyzátoru, jehož způsob přípravy a zpevňování byl citován v příkladu 1, o sušině 29,5 % hmot. Plocha patra 20 m^2, výška vrstvy biokatalyzátoru 0,1 m. Denitrifikační pochod probíhal za aerobních podmínek, procento nasycení kyslíkem v protékající vodě dosahovalo v posledním stupni kaskády 120 % hmot. /tj. 12,74 mg.l$^{-1}O_2$ při 12,5 °C/.

Po dobu jednoho týdne byla sledována denitrifikační účinnost jednotky. Voda odtékající z denitrifikační jednotky v průměru obsahovala:

NO_3^-	7,0 mg.l^{-1}
$CHSK_{Mn}$	8,0 mg.l^{-1}
pH	7,10
teplota	12,5 °C
nasycení kyslíkem	120 % hmot. /12,74 mg.l$^{-1}O_2$ při 12,5 °C/.

Zdenitrifikovaná voda je dále upravována klasickými upravárenskými postupy, tj. čiřením, filtrací a dezinfekcí.

Provozní zkouškou na denitrifikační jednotce byla prokazována denitrifikační účinnost biokatalyzátoru i při vysokém procentu nasycení vody kyslíkem.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob provedení disimilační denitrifikace vod buněčnými agregáty s denitrifikační aktivitou, vyznačující se tím, že vody obsahující dusičnany a/nebo dusitany v rozmezí koncentrací 0,001 $mg.litr^{-1}$ až 2 000 $mg.litr^{-1}$, se uvádí ve styk s imobilizovanými buněčnými agregáty v aerobním prostředí, při koncentraci kyslíku v rozmezí 0,2 $mg.litr^{-1}$ až do maximální saturace vod kyslíkem.