

RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC (RST)

-

FAZA DE EXECUȚIE NR. 2

CU TITLUL: Proiectarea și testarea unui sistem integrat de metode și tehnici de control al parametrilor proceselor de generare și de epurare a apelor uzate

REZUMAT

În cadrul etapei 2 au fost realizate activități de cercetare industrială și de diseminare în conformitate cu planul de realizare a proiectului. **Activitățile de cercetare industrială** au avut ca scop identificarea și testarea unor metode pentru controlul activității și viabilității nămolului activ implicat în procesul de epurare biologică a apelor uzate generate din procesul tehnologic de fabricație al SC AMBRO SA Suceava și au constat în:

- **Stabilirea perioadei de monitorizare** - pe baza rezultatelor obținute în prima etapă a proiectului cu privire la inventarierea principalelor surse de poluare a apelor de proces și a hărții punctelor de prelevare, în această etapă s-a stabilit de comun acord cu toți partenerii implicați în proiect programul de monitorizare, pentru perioada aprilie – noiembrie 2017, respectiv realizarea unei campanii de prelevare pe termen scurt în luna septembrie 2017;
- **Campanie de prelevare probe și efectuare măsurători** – prelevarea probelor s-a realizat având la bază harta punctelor de control elaborată în etapa 1, astfel: probe de apă uzată de la intrarea și evacuarea acesteia în/din stația de epurare și probe de suspensie de nămol activ din bazinele de aerare ale stației de epurare biologică, care au fost analizate din punct de vedere al caracteristicilor fizico-chimice (conținut de materii totale în suspensie și de materii volatile în suspensie), caracteristicilor microbiologice (număr de bacterii aerobe mezofile și colonii de drojdii și mucegaiuri), activității și viabilității (activitatea dehidrogenazei și teste de toxicitate bazate pe respirația bacteriană);
- **Dezvoltarea și testarea unor metode de determinare a viabilității și activității biomasei implicată în degradarea impurităților organice din apa uzată** - în cadrul campaniei de măsurători au fost dezvoltate și testate următoarele metode pentru determinarea viabilității n.a.: *activitatea dehidrogenazei* care are la bază principiul că enzimele dehidrogenazei sunt produse de toate celulele vii, iar măsura în care aceste enzime oxidează materia organică poate fi legată de numărul de celule vii prezente și *testele de respirație bacteriană* - testul de toxicitate Toxtrak - metoda colorimetrică de reducere a colorantului redox rezazurin; pe baza rezultatelor obținute se recomandă aplicarea acestor metode în monitorizarea efectuată de laboratorul stației de epurare, având în vedere că sunt metode de complexitate medie și rapide (durata aprox. 30 min.) care nu implică consum ridicat de materiale și energie;
- **Introducerea și testarea unor măsuri de reducere a fenomenului de dezvoltare a bacteriilor filamentoase** - pe lângă metodele de control al activității și viabilității nămolului activ implicat în procesul de degradare a materiei organice, s-a propus un set de măsuri cu scopul de îmbunătățire a performanțelor stației de epurare: monitorizarea și controlul nivelului nutrienților (raportul CBO:N:P), elaborarea bilanțului de materiale în cadrul stației de epurare, de testare a unor metode de reducere a concentrației indicatorilor care nu se încadrează în prezent în LMA de legislație, prin utilizarea procesului de adsorbție cu diferite materiale (de ex. zeoliți), în scopul completării stației de epurare cu o treaptă terțiară;
- **Organizare stării de practică studenți. Diseminare rezultate** - activitatea de practică și cercetare pentru studenții studiilor de masterat – specializarea Ingineria și Protecția Mediului – Facultatea de Inginerie și Agronomie din Brăila a fost condusă în scopul: furnizării sub aspect practic și teoretic a tehnicilor de determinare a caracteristicilor calitative și a informațiilor privind direcțiile de valorificare a nămolurilor rezultate de la epurarea apelor uzate industriale, în cadrul orelor de curs și laborator la disciplina *Tehnologii și echipamente de neutralizare a reziduurilor poluante*; elaborării lucrării de disertație cu tema: “*Direcții de valorificare a nămolurilor biologice rezultate de la epurarea apelor*”

uzate din procesul de fabricare a hârtiilor și cartoanelor”, în care s-a realizat un program de laborator de urmărire și evaluare a utilizării nămolului biologic generat la epurarea apelor de la fabricarea hârtiilor și cartoanelor din maculatură, în amestec cu solul, ca substrat pentru plantele de fasole și mază; diseminarea rezultatelor proiectului s-a realizat prin publicare de articole în reviste indexate ISI (1) , prezentare de comunicări la simpozioane internaționale organizate în țară și străinătate (4), organizare de workshop-uri pe tema epurării apelor, precum și prin intermediul site-ului proiectului <http://biowwater.ugal.ro> ;

- **Stabilirea punctelor permanente de investigare pe ansamblul procesului tehnologic de fabricație și în cadrul stației de epurare:** pentru etapa următoare se propun următoarele puncte de control care au implicații importante asupra parametrilor de epurare: *pentru apele uzate:* evacuare proces tehnologic (pct. 6 din harta punctelor de control), intrare (bazin de omogenizare) și ieșire din stația de epurare (pct.8, 9 din harta punctelor de control); *pentru nămolul activ:* bazinele de aerare B1, B2 (pct. 11 din harta punctelor de control)

Obiectivele etapei

- Testarea și introducerea unor metode de control și monitorizare a parametrilor procesului biologic de epurare (viabilitatea și activitatea culturii de microorganisme ca parametru esențial prin - testul de reductază și metoda de măsurare a nivelului ATP și a calității influentului) pentru restabilirea echilibrului microbiologic și aducerea stației de epurare la condiții normale de funcționare;
- Identificarea factorilor care influențează reacțiile metabolice ale culturii de microorganisme și stabilirea unui set de măsuri pentru combaterea fenomenului de dezvoltare necontrolată și excesivă a bacteriilor filamentoase (îmbolnăvirii biomasei) în bazinele de aerare;

IDENTIFICAREA UNOR METODE DE DETERMINARE A VIABILITĂȚII ȘI ACTIVITĂȚII NĂMOLULUI ACTIV

Pentru funcționarea instalațiilor de epurare biologică, viabilitatea și activitatea microorganismelor reprezintă un factor determinant, îndepărtarea substanțelor organice depinzând direct de numărul celulelor vii și de starea fiziologică a acestora.

În general, aprecierea cantitativă a nămolului se face prin determinarea materiilor totale în suspensie, atât ca substanță uscată cât și ca substanță volatilă, dar deoarece partea funcțională a nămolului este constituită din celule vii, această biomasă ar trebui limitată la masa microorganismelor viabile, deci la fracțiunea activă a nămolului.

În prezent, există câteva metode pentru determinarea activității nămolului activ, care vor fi prezentate în continuare.

2.3.1 Determinarea biomasei active

Parametrul standard al biomasei ce formează nămolul activ reprezintă partea volatilă a materiilor în suspensie numită *suspensii volatile*. De fapt, fracțiunea de biomasă volatilă, activă, depinde de fracțiunea organică a apei uzate brute și de vârsta nămolului (cu cât floconul este mai bătrân, cu atât procentul de polimeri intra- și extracelulari, inerți și greu degradabili, este mai mare). Fracțiunea biodegradabilă (aprox. 77%) poate fi un parametru al activității biologice a nămolului activ.

Fracțiunea biodegradabilă reprezintă diferența dintre suspensiile volatile inițiale ale unui nămol activ prelevat din instalație și suspensiile volatile ale aceluiași nămol după o perioadă de aerare extinsă (cca 30 de zile când degradarea nu mai are loc în continuare) raportată la suspensiile volatile inițiale; în continuare, masa activă relativă din sistemul cu nămol activ se obține prin împărțirea acestei fracții cu 0,77.

Evaluarea viabilității nămolului activ poate fi realizată prin **numărarea bacteriilor vii din unitatea de volum sau de greutate a nămolului** sau prin determinarea cantitativă a unor constituenți ai celulei vii. În general se folosește tehnica de numărare pe placă (plate counts), respectiv numărarea coloniilor bacteriene pe, sau în medii solidificate transparente, ca și tehnica numărării coloniilor pe filtre de membrană. Se folosesc medii de cultură cu extracte de nămol activ, care favorizează dezvoltarea unui număr substanțial mai mare de bacterii. Pentru exprimarea unităților de viabilitate este folosită **metoda Pike**. nămolul activ diluat cu soluție tampon TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) este dezintegrat cu ajutorul ultrasunetelor timp de 40, 60, 80 secunde, diluat în serie, trecut pe plăci de agar și incubat 7 zile la 22°C.

Testul ATP (acidul adenozintrifosforic sau adenozin trifosfat): metoda bazată pe reacția de bioluminescență a unui amestec de enzime *luciferină și luciferază* (licurici) și anume emiterea de lumină prin activarea extractului din cele două enzime de către ATP (figura 4) și măsurarea intensității acestuia cu ajutorul unui fotocolimetru (luminometru). Scăderea cantității de lumină emisă de bacteriile luminescente măsoară *toxicitatea sistemului*. Metoda de extracție a ATP din nămolul activ cu soluție la fierbere de tampon TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) sau cu soluție 5% de acid tricloracetic rece, fac din metodele bazate pe reacția de bioluminescență teste cantitative și rapide pentru măsurarea acestui component celular.

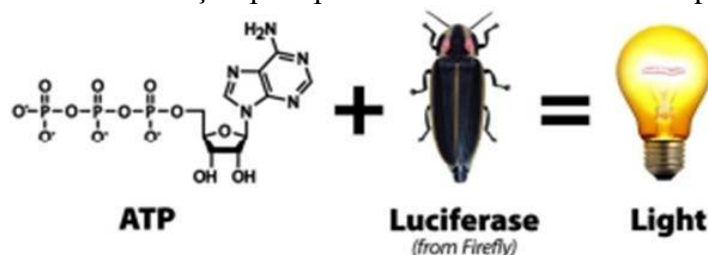


Figura 4 Reacția de bioluminescență a enzimelor luciferină+luciferază

În condițiile respirației endogene, cantitatea de ATP s-a dovedit satisfăcător constantă de aprox. 2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ material celular uscat pentru culturi pure și respectiv de 0,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ substanță volatilă pentru nămolul activ. Pentru nămolul activ, la încărcări organice mici, de 0,06 – 0,16 g/CCO/g s.u. , conținutul de ATP variază de la $3,39 \times 10^{-9}$ până la $3,56 \times 10^{-9}$ μg ATP/celulă.

Inhibitor: *fenolul* – acesta poate fi îndepărtat prin spălarea nămolului cu o soluție diluată de dodecilsulfat de sodiu.

2.3.2 Determinarea capacității de oxidare

În sistemele bacteriene heterotrofe aerobe, așa cum sunt cele care formează nămolul activ, capacitatea de oxidare a substanțelor organice poate indica nu numai biodegradabilitatea acestora sau tratabilitatea biologică a apelor uzate din care fac parte, dar și activitatea microorganismelor. Procesul de oxidare poate fi determinat direct, prin urmărirea consumului de oxigen, ultimul acceptor de hidrogen, ceea ce prezintă avantaje față de alte metode analitice, prin care trebuie întrerupt lanțul transportului de electroni, în scopul determinării unui metabolit intermediar. Consumul de oxigen se determină fie cu ajutorul respirometrelor de orice tip, fie cu ajutorul metodelor electrometrice, folosind electrodul de oxigen. Activitatea microorganismelor poate fi urmărită prin consumul de oxigen necesar respirației endogene. Din practica epurării apelor uzate cu nămol activ se apreciază valoarea consumului de oxigen endogen al nămolului normal, viabil, la 0,1-0,3 g O_2/g substanță uscată x zi, valori mai reduse față de acest interval fiind consecința unei activități metabolice, respectiv viabilități mai reduse.

O altă metodă constă în determinarea activității nămolului prin măsurarea variației concentrației în oxigen dizolvat, la echilibru, în probe de nămol activ aerate continuu, folosind ca substanță degradabilă acetatul de sodiu. În condițiile testului, activitatea nămolului exprimată în consum de oxigen este de 0,03 mg O_2/mg s.u. și oră.

2.3.3. Testul de reductază

Metoda excluderii cu Trypan Blue (colorant azoic derivat din toluidină)

Constă în tratarea probei de nămol cu o soluție diluată de Trypan Blue (0,4% - 0,5% în soluție tampon fosfatică). Numărarea celulelor se face cu ajutorul unei camere de numărare. Celulele moarte vor fi colorate în albastru, iar cele vii vor rămâne incolore. (figura 5)



Figura 5 Evidențierea celulelor vii și moarte cu ajutorul colorantului *Trypan Blue*

Determinarea viabilității are la bază formula: *Viabilitatea, % = număr celule vii/număr total de celule*

Activitatea dehidrogenazică

Testarea activității dehidrogenazei se bazează pe principiul că enzimele dehidrogenazei sunt produse de toate celulele vii și măsura în care această grupă enzimatică oxidează materia organică poate fi legată de numărul de celule vii prezente. Acest grup de enzime transportă electroni și hidrogen printr-un lanț de purtători de electroni intermediari către un acceptor de electroni final (oxigen), rezultând formarea de apă.

Activitatea coenzimelor nicotin-amida-adenin-dinucleotidă (NAD) și flavin-adenin-dinucleotidă (FAD) care acționează ca electroactivatori intermediari poate fi măsurată prin modificarea culorii vizibile a unui

colorant cum ar fi clorura de trifenil tetrazoliu (TTC). Procesul de măsurare a activității dehidrogenazei implică incubarea probei în prezența clorurii de trifenil tetrazoliu și a unui substrat donator de electroni. În forma sa oxidată, TTC este incolor, dar în prezența enzimelor dehidrogenazei, TTC este redus la trifenil formazan (TF), un compus de culoare roșie, insolubil în apă. Mecanismul procedurii este prezentat în figura 6. Trifenil formazanul poate fi extras din celule utilizând un solvent (alcool etilic sau metilic) iar concentrația sa este determinată colorimetric prin măsurarea absorbției la 484 nm. Față de alte metode, această tehnică are avantajul cuantificării numărului de celule vii prezente în mediu și poate fi realizată într-un timp relativ scurt și cu costuri reduse.

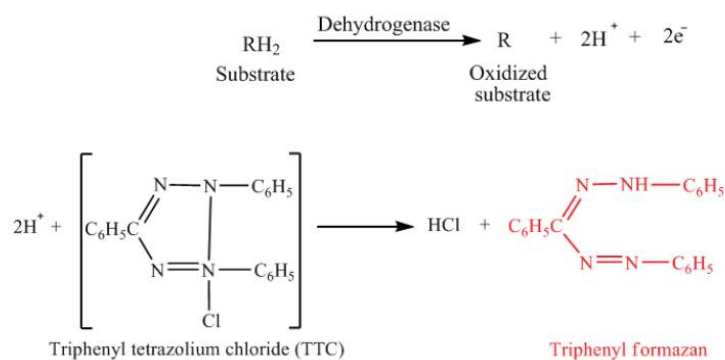
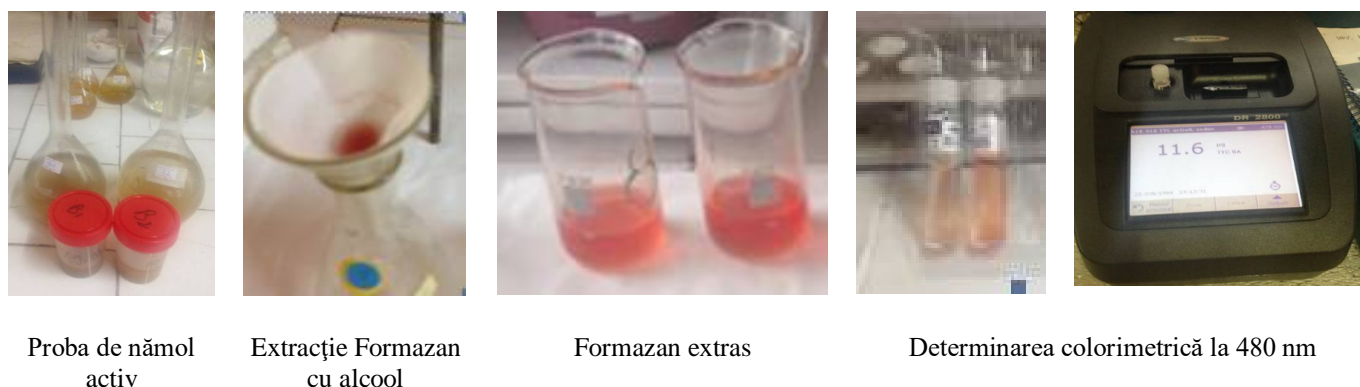


Figura 6 Mecanismul activității dehidrogenazice

Între consumul de oxigen și producția de formazan a nămolului activ există o bună legătură. Astfel, activitatea dehidrogenazică raportată la celula vie din nămolul activ a fost găsită relativ constantă la vitezele nete de creștere a biomasei în limite largi, și anume: $1,9 \times 10^{-8} \mu\text{g}$ formazan/celulă și oră. Raportată la întreaga biomasă, valoarea activității dehidrogenazice a nămolului activ funcționând cu eficiență bună de îndepărtare a substanțelor organice, a fost găsită mai mare decât 10 mg formazan/g substanță volatilă și oră. De asemenea, în acord cu legătura directă a activității dehidrogenazice cu numărul celulelor viabile, au fost găsite relații matematice între concentrația suspensiilor din nămolul activ și activitatea dehidrogenazică. Informațiile oferite de acest test sunt utile în cazul intoxicării nămolului, observându-se o remarcabilă scădere a concentrației de formazan față de aceea determinată pentru nămolul activ neintoxicat.



Etapele procesului de extracție a formazanului din celula bacteriană cu ajutorul CCT

2.3.4 Determinarea biomasei active – teste de toxicitate

Metoda colorimetrică Toxtrak (Metoda Hach)

Testul de toxicitate Toxtrak are la bază metoda colorimetrică de reducere prin respirație bacteriană; testul conține un inocul gata preparat cu o bacterie de control (*E.coli*). Prin respirație bacteriană, colorantul

resazurin, redox activ este redus și își schimbă culoarea de la albastru la roz violet (resorufin) (figura 7). În stare oxidată colorantul redox resazurin este albastru – starea inițială la începutul testului. Bacteriile prezente oxidează glucoza adăugată la proba de analizat și reduce resazurina. În prima etapă resazurina este redusă de $2e^-$ la resorufin care are culoarea roz violet. Acesta poate fi redus suplimentar de alți $2e^-$ la dehidroresorufin care este incolor. Substanțele toxice pot inhiba gradul de reducere al resazurinei. Se determină densitatea bacteriană prin măsurarea absorbției (la 603 nm) probelor de analizat la timpul inițial și la timpul final (după decolorare). Timpul final se stabilește în funcție de o probă de control. Este important ca citirea absorbției să se realizeze înaintea reducerii suplimentare a resorufinei pentru a preveni interferențele.

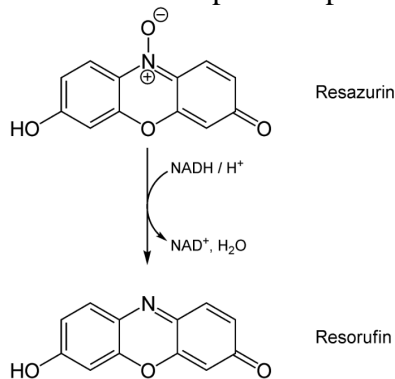


Figura 7 Mecanismul de reducere a colorantului resazurin prin respirație bacteriană

Atunci când diferența de absorbantă a probei de control este de $0,6 \pm 0,1$ (aceasta poate dura 45 – 75 min.), se apreciază timpul final (citirea se face cu ajutorul unui fotocolorimetru).

Toxicitatea sistemului este apreciată prin **gradul de inhibiție** care se calculează cu relația:

$$\% I = [1 - (\Delta \text{Abs. probă} / \Delta \text{Abs. control})] \times 100, \text{ în care:}$$

$\Delta \text{Abs. probă}$ = absorbanta probei (timp inițial) – absorbanta probei (timp final), 603 nm

$\Delta \text{Abs. control}$ = absorbanta control (timp inițial) – absorbanta control (timp final), 603 nm

Comparativ cu alte metode de determinare a gradului de toxicitate, metoda Hach ToxTrak este foarte rapidă, permițând utilizarea unei tehnici fotocolorimetrice simple și ieftine, fără extracția, centrifugarea sau filtrarea probei. Gradul de inhibiție poate fi apreciat și vizual, iar metoda poate fi aplicată pentru diferite specii de bacterii sau amestecuri de culturi bacteriene. Gradul de inhibiție reprezintă o determinare relativă. Rezultatele obținute nu exprimă o măsurătoare cantitativă a concentrației de substanță toxică. Astfel gradul de inhibiție nu este direct proporțional cu prezența sau cu creșterea concentrației de substanță toxică în sistem. Pentru a determina gradul minim de inhibiție, sunt necesare diluții repetate pentru care se determină gradul de inhibiție până la limita la care acesta nu mai este observat. Dacă proba arată un grad de inhibiție mai mic de 10% este recomandată repetarea testului.

Rezultate privind toxicitatea:

Procent de inhibiție, %	Concluzii
7%, 9%, 5%, 8%, 5%	Poate fi ușor toxic
7%, -4%, -5%, 5%, 1%	Nu este toxic
-7%, -9%, -5%, -8%, -5%	Poate fi ușor toxic

Câteva exemple cu privire la gradele de inhibiție înregistrate cu metoda ToxTrak în corelație cu substanțele toxice prezente în sistem, sunt prezentate mai jos:

Substanța toxică	Gradul de inhibiție obținut în urma utilizării metodei ToxTrak™
Cu^{2+} 2 mg/L	52%, 61%, 59%, 57%, 68%, 57%, 73%, 63%, 73%
Cu^{2+} 0,2 mg/L	53%, 48%, 56%, 49%, 73%, 55%, 59%, 58%, 64%
Cu^{2+} 0,02 mg/L	-7%, 8%, -6%, 3%, 0%, -12%
Formaldehidă 0.005%	9%, 13%
Hg^{2+} 5 mg/L	22%, 36%, 38%
Fenol 10mg/L	1%
CN^- 0.1 mg/L	10%

2.3.5 Determinarea tipurilor de specii de bacterii aerobe mezofile implicate în procesul de degradare

Madoni (1993) a propus anumite caracteristici ale culturii de microorganisme care trebuie considerate ca și criterii de definire a unui proces eficient de epurare biologică cu nămol activ și anume:

- un nivel ridicat al comunității microbiene ($> 10^6$ unități celulare/l);
- microorganismele trebuie să cuprindă în principal specii de protozoare ciliate, fără prezența speciilor flagelate ;
- specii și grupuri de ciliate extrem de diversificate și nici una dominantă numeric peste celelalte, cu un factor mai mare de 10;

Astfel, speciile de bacterii ciliate sunt considerate cele mai importante populații bacteriene de protozoare implicate în procesele de degradare din bazinele de aerare ale instalației de epurare biologică a apelor. Curds și Madoni clasifică aceste comunități microbiene în patru grupe, în funcție de necesitățile nutriționale, forma de mișcare, și localizarea fizică în raport cu unitatea structurală a nămolului activ (floconul) :

- **ciliate libere** (free swimming ciliates) – care nu sunt asociate floconului, distribuite uniform (*Paramecium* sp or *Uronema nigricans*);
- **ciliate târâtoare** (crawling ciliates)- care se deplasează pe suprafața floconului de nămol activ cu celule înclinate și cu cilindru ventral specializat în principal (*Euplotes* and *Aspidisca* species);
- **ciliate atașate** (stalked ciliates)– care sunt fixate pe floconul de nămol activ attached ciliates printr-o tulpină (*Vorticella convallaria* or *Thuricola* sp or *Vaginicola* sp), etc.
- **ciliate carnivore** (carnivorous ciliates)– libere sau atașate care se hrănesc cu anumite specii de flagelate sau cu alte ciliate carnivorous ciliates.

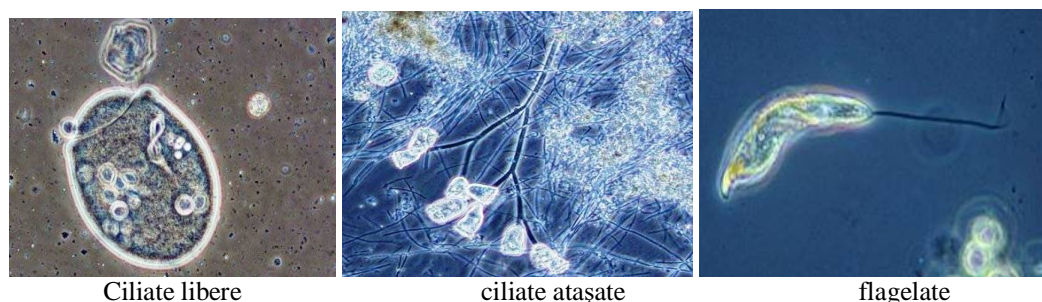


Figura 8 Comunități microbiene asociate nămolului activ

Bibliografie

1. Wisconsin Department of Natural Resources, Bureau of Science Services, Operator Certification Program, *Advanced Activated Sludge Study Guide*, December 2010 Edition, <http://dnr.wi.gov>
2. T. J. Burdock, M.S. Brooks* and A.E. Ghaly, *A Dehydrogenase Activity Test for Monitoring the Growth of Streptomyces Venezuelae in a Nutrient Rich Medium*, J Bioprocess Biotechniq 2011, 1:1
3. FLORIN AONOFRIESEI and MIHAELA PETROSANU, Activated sludge bulking episodes and dominant filamentous bacteria at waste water treatment plant Constanța Sud (Romania), Proc. Rom. Acad., Series B, 2007, 2, p. 83–87
4. Shiyang Sun, Zhiguo Guo, Ruili Yang, Zhigang Sheng and Peng Cao, *Study on the triphenyl tetrazolium chloride–dehydrogenase activity (TTC-DHA) method in determination of bioactivity for treating tomato paste wastewater*, African Journal of Biotechnology Vol. 11(27), pp. 7055-7062, 3 April, 2012
5. L. Arregui, B. Pérez-Uz, H. Salvadó and S. Serrano, *Progresses on the knowledge about the ecological function and structure of the protists community in activated sludge wastewater treatment plants*, Formatex 2010
6. Liliana Araújo dos Santos, Vânia Ferreira, Maria Olívia Pereira, Ana Nicolau, *Relationship between protozoan and metazoan communities and operation and performance parameters in a textile sewage activated sludge system*, European Journal of Protistology 50 (2014) 319–328
7. Jason Calhoun, PE POLYTEC, INC, 3-22-12, *Microscopic Techniques to Troubleshoot Activated Sludge, Problems and Control*
8. P. Madoni, *Protozoa in wastewater treatment processes: A minireview*, Italian Journal of Zoology, ISSN: 1125-0003 (Print) 1748-5851 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tizo20>
9. Nader Bahramifar, Noushin Birjandi, Habibollah Younesi, *Treatment of wastewater effluents from paper-recycling plants by coagulation process and optimization of treatment conditions with response surface methodology*, Appl Water Sci (2016) 6:339–348
10. K Rajkumar*, *An Evaluation of Biological Approach for the Effluent Treatment of Paper Boards Industry - An Economic Perspective*, J Bioremediat Biodegrad 2016, 7:5
11. Virendra Kumar, Purnima Dhall, Sanjay Naithani, Anil Kumar and Rita Kumar, *Biological Approach for the Treatment of Pulp and Paper Industry Effluent in Sequence Batch Reactor*, Bioremed Biodeg 2014, 5:3
12. P.Nechita, *Procese și echipamente pentru protejarea și epurarea apelor*, Ed. Europlus Galați, (2014)
13. C. M. Simonescu – *Epurarea biologică a apelor uzate* – Ed. Matrix Rom București, 2009 *Epurarea biologică a apelor uzate*
14. P. A. Whalen*, P. J. Whalen, D. R. Tracey, *Improving biological wastewater treatment process control through ATP-based parameters*, 2006, Water Environment Foundation.
15. P.Norman, P.Whalen, *A new method for upset prediction: ATP based biomonitoring and statistical process analysis at two refinery wastewater plants*, 2011, Technical paper at General Electric Company
16. Marwa F. Abed, Mohammed Y. AL- Ani, Faris H. Al-Ani, *Advance Wastewater Treatment; Biological Removal of Eutrophic Nutrients*, Eng. &Tech.Journal, Vol.33,Part (A), No.5, 2015
17. C. Delporte, V. Todorova, *Control of active biomass in biological waste water treatment systems through new generation of ATP-metry: improving effluent toxicity monitoring and optimization of performances in bioreactors*, www.aqua-tools.com
18. P.Madoni, *A sludge biotic index (sbi) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis*, Wat. Res. Vol. 28, No. 1, 1994