

VEIKLIOJO DUMBLO KATALAZINIO AKTYVUMO TYRIMAS

Miglė Puodžiūnaitė¹, Aušra Mažeikienė²

*Vilniaus Gedimino technikos universitetas, Aplinkos inžinerijos fakultetas,
Aplinkos apsaugos ir vandens inžinerijos katedra*

El. p. ¹puodziunaite.m@gmail.com; ²ausra.mazeikiene@vilniustech.lt

Anotacija. Veikliojo dumblo biocheminis aktyvumas įvertinamas pagal fermentų kiekį veikliajame dumble. Fermentinio (katalazinio) aktyvumo tyrimai yra susiję su vandens ar nuotekų valymu. Šio darbo tikslas – išmatuoti katalazinį aktyvumą veikliojo dumblo mėginiuose ir surasti priklausomybes tarp dumblo katalazinio aktyvumo ir nuotekų valymo rodiklių. Atlikus titrometrinį katalazinio aktyvumo tyrimą ir nustatčius ryšį su nuotekų valymo efektyvumu, buvo pastebėtos priklausomybės. Tarp katalazinio aktyvumo ir išvalytų nuotekų biocheminio deguonies suvartojimo pastebėta stipri polinominė priklausomybė ($R^2 = 0,99$), tarp katalazinio aktyvumo ir amonio azoto pastebėta stipri logaritminė priklausomybė ($R^2 = 0,98$), o tarp katalazinio aktyvumo bei nitratų azoto pastebėta stipri polinominė priklausomybė ($R^2 = 0,87$).

Reikšminiai žodžiai: veiklusis dumblas, katalazinis aktyvumas, nuotekų valymo rodikliai, biologinis nuotekų valymas.

Įvadas

Veikliojo dumblo (VD) mikroorganizmų sugebėjimas oksiduoti nuotekose esančias organines medžiagas vadinamas biocheminiu aktyvumu (Gonzalez-Martinez et al., 2015). VD biocheminis aktyvumas įvertinamas pagal vandenyje ištirpusio deguonies suvartojimo greitį ir pagal fermentų kiekį veikliajame dumble (Guwy et al., 1998; Siddique ir Wahid, 2012). Didžiausią indėlį į teršalų biodegradaciją įneša fermentai, priklausantys oksidoreduktazių ir hidrolazių klasėms. Vienos iš oksidazių yra katalazės, kurių aktyvumas koreliuoja su nuotekų biocheminiu deguonies suvartojimu (BDS), todėl katalazinio aktyvumo tyrimai yra susiję su vandens ar nuotekų valymu (Hosetti ir Frost, 1994; Lv et al., 2008; Arvin ir Pedersen, 2015; Amariei et al., 2020). Vandens terpėje esantis vandenilio peroksidas (H_2O_2) sąveikauja su nesočiosiomis riebalų rūgštimis, todėl pažeidžiamos ląstelių membranos. Be to, H_2O_2 gali oksiduoti mikroorganizmų ląstelėse esančias merkaptų (-SH) grupes, kurios padeda palaikyti sudėtingas baltymų struktūras. Visi fermentai yra baltymai, oksidavus merkaptų grupes, slopinamas fermentų aktyvumas (Siddique ir Wahid, 2012). Naudojamosi fermento katalaze, aerobinės ląstelės ginasi nuo kenksmingo vandenilio peroksido (H_2O_2) poveikio. Veik-

liamas katalazės, vandenilio peroksidas suskaidomas į du ląstelėms nepavojingus produktus: vandenį ir deguonį.

Vandens ar nuotekų užterštumui organinėmis medžiagomis įvertinti dažniausiai naudojami BDS₅, BDS₇ ir ChDS rodikliai (Bhave et al., 2020). Tyrimais įrodyta, kad tarp VD katalazinio aktyvumo ir nuotekų BDS₅ yra tiesioginė priklausomybė (Yin et al., 2013). Todėl, nustatčius katalazinį aktyvumą tiriamajame vandenyje, galima apytikriai įvertinti BDS₅ (nelaukiant penkių parų), t. y. greičiau gauti informaciją: naudojantis šia informacija galima operatyviai valdyti nuotekų valymo įrenginių darbą. Pagal katalazės aktyvumą galima įvertinti nuotekų kokybę ir savaiminio vandens apsivalymo upėse greitį (maksimalus katalazės aktyvumas randamas zonose, kuriose yra didelis BDS lygis ir didelis bakterijų kiekis (Gupta et al., 2017). Sumažėjęs katalazės aktyvumas gali būti laikomas upių apsivalymo rodikliu (Hosetti ir Frost, 1994). Pagal katalazės aktyvumą galima įvertinti biocenozės (VD ar bioplėvelės) fiziologinę būklę. Daugelis toksiškų medžiagų slopina katalazės veiklą, pvz., pastebėta tiesioginė priklausomybė tarp sieros vandenilio (H_2S) koncentracijos ir katalazinio aktyvumo sumažėjimo. Taip pat veikliojo dumblo mikroorganizmų katalazinį aktyvumą mažina tetrahidrofuranas (tirpiklis, plačiai naudojamas pramonėje ir laboratoriniams tyrimams) ir

triklozanas (Lv et al., 2008; Amariei et al., 2020). Dėl šių priežasčių katalazės aktyvumo veikliajame dumble sumažėjimas gali būti valomų nuotekų toksiškumo rodiklis (Fontenot et al., 2007). Katalazės aktyvumas gali būti matuojamas keliais būdais: kolorimetriniu, manometriniu, elektrocheminiu, spektrofotometriniu ir titrometriniu metodu. Titrometrinis metodas yra gana paprastas ir nebrangus, todėl jis yra patogiausias veikliojo dumblo katalazinio aktyvumui nustatyti. Metodo esmė: kalio permanganatu (KMnO_4) titruojamas nesuskaidytas H_2O_2 rūgštinėje terpėje.

Darbo tikslas – išmatuoti katalazinį aktyvumą veikliojo dumblo mėginiuose ir surasti priklausomybes tarp VD katalazinio aktyvumo ir nuotekų valymo rodiklių.

Metodika

Katalazinis aktyvumas buvo nustatomas individualaus nuotekų valymo įrenginio NVĮ-118 veikliojo dumblo suspensijoje 2020-09-09 – 2020-09-30 laikotarpiu. NVĮ darbo protokolai gauti iš jo gamintojų (UAB Biotechnologijos grupė). Valomų ir išvalytų nuotekų bei VD mėginiai buvo imami ir tiriami kas savaitę (per vieno mėnesio laikotarpį 4 kartus). Nuotekų mėginiai buvo tiriami Nuotekų valymo įrenginių laboratorijoje (Maišiagala, Vilniaus r.). VD mėginiai, pasemti iš NVĮ aeracinės zonos, plastikiniame 1,5 l talpos inde (indas pripildytas 2/3 nedelsiant buvo vežami į VGTU Aplinkos apsaugos ir vandens inžinerijos katedros laboratoriją. Šioje laboratorijoje buvo matuojama VD koncentracija (sausas masė litre) ir katalazinis aktyvumas. Dumblo suspensijos sausasis svoris nustatomas taip: išdžiovintas iki pastovaus svorio filtras (džiovinama 105 °C temperatūroje krosnyje, atvėsinama eksikatoriuje ir pasverama) įdedamas į Biuchnerio piltuvą, piltuvą įstatomas į Bunzeno kolbą ir prijungiama prie vandens siurbliuko. Žinomas tūris (20–25 ml ar daugiau) gerai išmaišyto dumblo nufiltruojama per šį filtrą. Surinktas ant filtro dumblas kartu su filtru pernešamas į biuksiuką ir išdžiovinamas 105 °C temperatūroje iki pastovaus svorio.

Katalaziniam aktyvumui nustatyti į mėgintuvėlį buvo įpilama 5 ml gerai išmaišytos veikliojo dumblo suspensijos ir pridedama 1,7 ml 1 % H_2O_2 tirpalo, tuomet išlaikoma 30 min. kambario temperatūroje. Paskui pridedama 5 ml 10 % H_2SO_4 tirpalo ir, perpylus mišinį į Erlenmejerio kolbutę, titruojama su 20 mM KMnO_4 tirpalu tol, kol tirpalas įgauna silpnai rožinę spalvą (kuri neišnyksta per 30 s): pasižymimas titruoti sunaudoto KMnO_4 tirpalo tūris. Tokiu pačiu būdu paruošiami ir titrujami

2–3 tos pačios dumblo suspensijos mėginiai. Analogišku būdu titruojamas kontrolinis mėginys su inaktyvuotu fermentu. Fermento inaktyvacijai į mėgintuvėlį su 5 ml veikliojo dumblo suspensijos iš karto įpilama 5 ml 10 % H_2SO_4 tirpalo (paskui dedama H_2O_2). Katalazės aktyvumas išreiškiamas $\mu\text{M}/(\text{ml} \cdot \text{min})$ arba $\mu\text{M}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ ir apskaičiuojamas pagal formulę:

$$A = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 50}{C \cdot t}, \quad (1)$$

čia V_1 ir V_2 – 20 mM KMnO_4 tirpalo tūriai, sunaudoti kontroliniam ir bandomajam mėginiui nutitruoti (ml); 50 – koeficientas, parodantis H_2O_2 kiekį (μmol), atitinkantį 20 mM KMnO_4 tirpalo 1 ml; C – dumblo mėginio tūris (ml) arba baltymo kiekis mėginyje, mg; t – inkubacijos laikas, min.

Rezultatai ir jų analizė

Atlikus tiriamojo NVĮ darbo protokolų analizę, gauti duomenys pateikti 1 ir 2 lentelėse. Veiklųjį dumblą apibūdinantys rodikliai pateikti 3 lentelėje.

1 lentelė. Įtekų (į NVĮ) rodiklių duomenys

Įtekų	Vidurkis, mg/l	Standartinis nuokrypis, mg/l	Mediana, mg/l	Didžiausia reikšmė, mg/l	Mažiausia reikšmė, mg/l
BDS ₅	370,00	100,33	395,00	460	230
ChDS	741,00	155,07	757,50	904	545
SM	388,75	138,23	402,50	540	210
N _{kj}	84,15	8,30	86,55	91,3	72,2
P	11,20	2,13	11,05	13,8	8,89
NH ₄ -N	81,75	9,98	84,70	90,2	67,4

2 lentelė. Ištekų (iš NVĮ) rodiklių duomenys

Išteklų	Vidurkis, mg/l	Standartinis nuokrypis, mg/l	Mediana, mg/l	Didžiausia reikšmė, mg/l	Mažiausia reikšmė, mg/l
BDS ₅	5,63	2,29	4,75	9,00	4,00
ChDS	38,25	16,52	30,50	63,00	29,00
SM	11,50	15,01	4,40	34,00	3,20
N _{kj}	5,48	2,54	5,22	8,40	3,08
NO ₂ -N	0,30	0,19	0,22	0,58	0,17
NO ₃ -N	6,90	8,77	2,85	20,00	1,90
Nb	12,69	7,13	9,78	23,27	7,92
P	1,61	0,39	1,60	2,05	1,18
NH ₄ -N	3,63	3,01	3,65	7,17	0,05

3 lentelė. VD rodiklių duomenys

Rodiklis	Vidurkis	Standartinis nuokrypis	Mediana	Didžiausia reikšmė	Mažiausia reikšmė
Veikliojo dumblo koncentracija, mg/l	53,6	1,13	53,5	6,68	4,07
Katalazės aktyvumas, A, $\mu\text{M}/(\text{ml}\cdot\text{min})$	0,89	0,23	0,86	1,18	0,64

Iš 1 lentelės matyti, kad valomų nuotekų užterštumas tiriamuoju laikotarpiu gana smarkiai svyravo: BDS₅, ChDS, SM rodiklių didžiausios reikšmės buvo du kartus didesnės už mažiausias reikšmes, N_{kj} ir P rodiklių didžiausios reikšmės buvo 1,3–1,5 kartus didesnės už mažiausias reikšmes. Iš 2 lentelės matyti, kad išvalytų nuotekų (ištekų) rodikliai taip pat smarkiai svyravo: BDS₅, ChDS rodiklių didžiausios reikšmės buvo du kartus didesnės už mažiausias reikšmes, SM rodiklio didžiausia reikšmė buvo 10 kartų didesnė už mažiausią reikšmę, N_b rodiklio didžiausia reikšmė buvo tris kartus didesnė už mažiausią reikšmę ir P rodiklio didžiausia reikšmė buvo du kartus didesnė už mažiausią reikšmę. Iš 3 lentelės matyti, kad katalazės aktyvumo mažiausia ir didžiausia reikšmė taip pat skyrėsi du kartus, o VD koncentracijos – 1,7 karto.

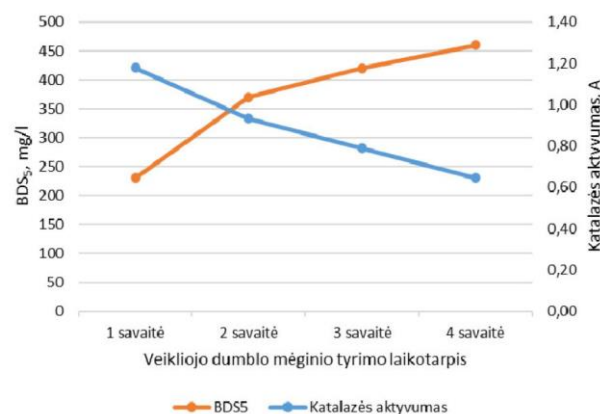
Katalazės aktyvumo ryšys su nuotekų valymo rodikliais parodytas 1–6 paveiksluose.

1 ir 2 pav. matyti, kad katalazės aktyvumas nepriklausė nuo atitekančių nuotekų BDS₅, tačiau yra stiprus ryšys tarp ištekančių nuotekų BDS₅ ir katalazės aktyvumo. 3 pav. matyti, kad tarp šių rodiklių egzistuoja polinominė priklausomybė, kurios determinacijos koeficientas yra 0,9994, o tai rodo labai stiprų koreliacinį ryšį.

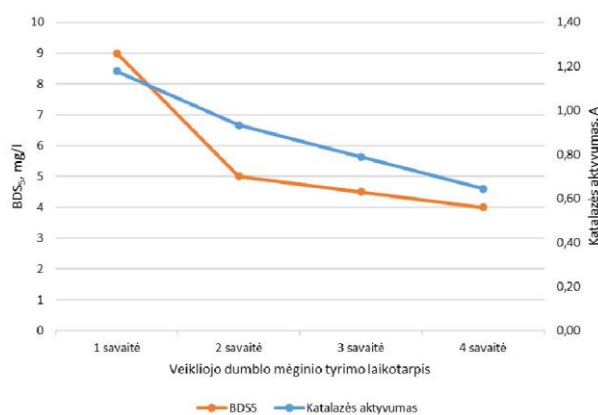
4 pav. matyti, kaip kinta NH₄-N šalinimo efektyvumas ir katalazės aktyvumas laiko atžvilgiu. Katalazės aktyvumas, kaip ir NH₄-N šalinimo efektyvumas, laikui bėgant mažėja.

5 pav. matyti, kad tarp šių rodiklių yra logaritminė priklausomybė – didėjant katalazės aktyvumui, didėja ir šalinimo efektyvumas. Determinacijos koeficientas – 0,9827, kuris rodo stiprų koreliacinį ryšį.

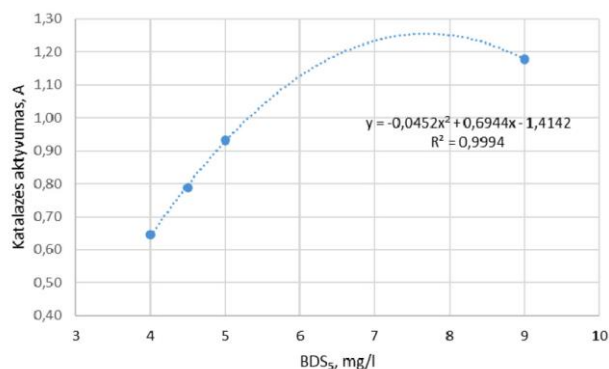
6 paveiksle matyti, kad tarp katalazės aktyvumo ir nitratų šalinimo efektyvumo yra polinominė priklausomybė, kurios determinacijos koeficientas yra 0,8735.



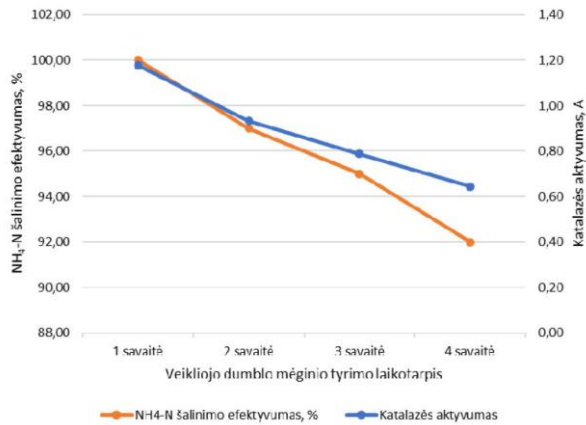
1 paveikslas. Atitekančių nuotekų BDS₅ ir katalazės aktyvumo rodikliai tyrimo laikotarpiu. A = $\mu\text{M}/(\text{ml}\cdot\text{min})$



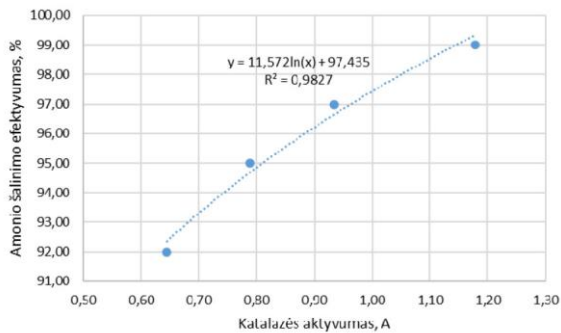
2 paveikslas. Ištekančių nuotekų BDS₅ ir katalazės aktyvumo rodikliai tyrimo laikotarpiu. A = $\mu\text{M}/(\text{ml}\cdot\text{min})$



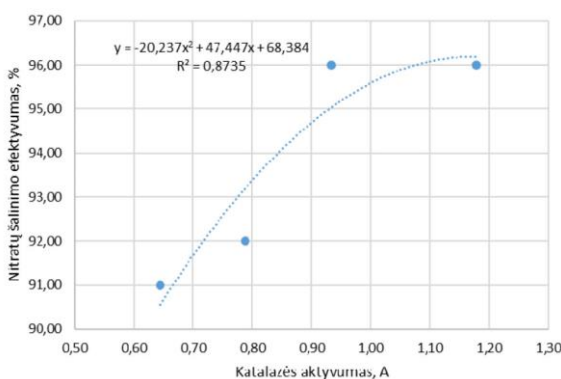
3 paveikslas. Katalazės aktyvumo priklausomybė nuo BDS₅. A = $\mu\text{M}/(\text{ml}\cdot\text{min})$



4 paveikslas. $\text{NH}_4\text{-N}$ šalinimo efektyvumo ir katalazės aktyvumo parametrų kitimas laiko atžvilgiu. $A = \mu\text{M}/(\text{ml}\cdot\text{min})$



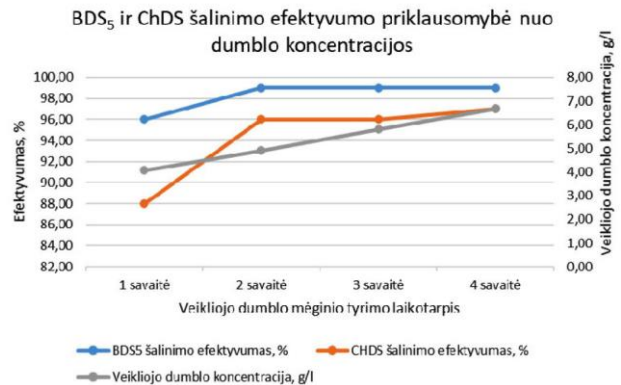
5 paveikslas. Amonio šalinimo efektyvumo priklausomybė nuo katalazės aktyvumo. $A = \mu\text{M}/(\text{ml}\cdot\text{min})$



6 paveikslas. Nitratų šalinimo efektyvumo priklausomybė nuo katalazės aktyvumo. $A = \mu\text{M}/(\text{ml}\cdot\text{min})$

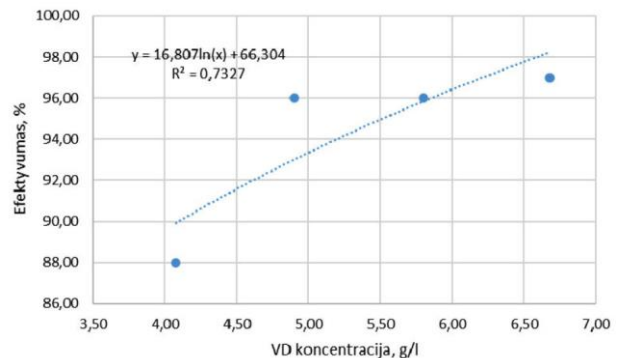
Veikliojo dumblo koncentracijos ryšys su nuotekų valymo rodikliais parodytas 7 ir 8 pav. 7 pav. matyti, kaip kinta BDS_5 ir ChDS šalinimo efektyvumo ir dumblo kon-

centracijos parametrai laiko atžvilgiu. Visi trys parametrai laikui bėgant didėja.



7 paveikslas. BDS_5 ir ChDS šalinimo efektyvumo ir dumblo koncentracijos parametrų kitimas laiko atžvilgiu

8 pav. matyti, kad tarp dumblo koncentracijos ir ChDS šalinimo efektyvumo egzistuoja logaritminė priklausomybė: didėjant veikliojo dumblo masei, didėja ir ChDS šalinimo efektyvumas. Šios priklausomybės determinacijos koeficientas yra 0,7327.



8 paveikslas. ChDS šalinimo efektyvumo priklausomybė nuo dumblo koncentracijos

Iš paveiksluose pateiktų rezultatų galima spręsti, kad VD katalazinis aktyvumas yra susijęs su nuotekų išvalymo rodikliais: yra stiprios priklausomybės tarp katalazinio aktyvumo ir išvalytų nuotekų BDS_5 , amonio azoto ir nitratų azoto likučio. Priklausomybė tarp katalazinio aktyvumo ir fosforo koncentracijos nuotekose nepastebėta. Nuotekų valymo efektyvumas priklauso nuo VD koncentracijos nuotekų valymo įrenginyje: didėjant VD koncentracijai, didėja BDS_5 ir ChDS šalinimo efektyvumas.

J. Fangas et al. (2010 m.) savo tyrime apie ureazės ir katalazės reguliavimą aktyviajame dumble nustatė, jog biologinio nuotekų valymo metu ureazė ir katalazės aktyvumas buvo glaudžiai susijęs su dumblo aplinka. Aktyviojo dumblo aplinkoje fermentinis aktyvumas buvo mažas pradiniame ir adaptaciniame procese, bet smarkiai išaugo ir išlaikė stabilumą brendimo laikotarpiu. Be to, buvo pastebėtas akivaizdus ryšys tarp fermento aktyvumo ir vyraujančios floros sistemoje. Todėl aktyviojo dumblo sistemos būklę ir aktyvumą galėtų gerai apibūdinti ureazės ir katalazės veikla. Šio tyrimo metu taip pat pastebėta, kad kai sistema veikė stabiliai, pastebėta koreliacija tarp ureazės bei katalazės aktyvumo ir aktyviojo dumblo sistemos ChDS pašalinimo greičio. Šie rezultatai sutampa su gautais rezultatais atlikto tyrimo metu.

Išvados

1. Valomų nuotekų užterštumas tiriamuoju laikotarpiu gana smarkiai svyravo, atskirų rodiklių didžiausios reikšmės buvo 1,5–2 kartus didesnės už mažiausias reikšmes.
2. Tarp katalazinio aktyvumo ir išvalytų nuotekų BDS₅, amonio azoto ir nitratų azoto likučio pastebėtas stiprus ryšys (atitinkamai $R^2 = 0,99$, $R^2 = 0,98$, $R^2 = 0,87$).
3. Tarp katalazinio aktyvumo ir fosforo koncentracijos nuotekose priklausomybės nepastebėta.
4. Organinių medžiagų valymo iš nuotekų efektyvumas priklauso nuo VD koncentracijos nuotekų valymo įrenginyje: didėjant VD koncentracijai, didėja BDS₅ ir ChDS šalinimo efektyvumas.

Literatūra

- Amariei, G., Boltes, K., Rosal, R., & Leton, P. (2020) Enzyme response of activated sludge to a mixture of emerging contaminants in continuous exposure. *PLoS ONE*, 15(1), e0227267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227267>
- Arvin, E., & Pedersen, L. F. (2015). Hydrogen peroxide decomposition kinetics in aquaculture water. *Aquacultural Engineering*, 64, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.12.004>
- Bhave P. P., Naik, S., & Salunkhe, S. D. (2020). Performance evaluation of wastewater treatment plant. *Water Conservation Science and Engineering*, 5, 23–29. <https://doi.org/10.1007/s41101-020-00081-x>
- Fang, J., Ju, O., Qiu, J., & Chen, K. (2010, June). Regularity for change of urease and catalase in wastewater treatment with activated sludge process. In *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* (pp. 1–5). IEEE. <https://doi.org/10.1109/ICBBE.2010.5515691>
- Fontenot, Q., Bonvillain, C., Kilgen, M., & Boopathy, R. (2007). Effects of temperature, salinity, and carbon: Nitrogen ratio on sequencing batch reactor treating shrimp aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, 98(9), 1700–1703. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.031>
- Gonzalez-Martinez, A., Rodriguez-Sanchez, A., Muñoz-Palazon, B., Garcia-Ruiz, M. J., Osorio, F., Van Loosdrecht, M. C. M., & Gonzalez-Lopez, J. (2015). Microbial community analysis of a full-scale DEMON bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 499–508. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1289-z>
- Gupta, N., Pandey, P., & Hussain, J. (2017). Effect of physico-chemical and biological parameters on the quality of river water of Narmada, Madhya Pradesh, India. *Water Science*, 31(1), 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.wsj.2017.03.002>
- Guwy, A. J., Buckland, H., Hawkes, F. R., & Hawkes, D. L. (1998). Active biomass in activated sludge: Comparison of respirometry with catalase activity measured using an online monitor. *Water Research*, 32(12), 3705–3709. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00157-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00157-2)
- Hosetti, B. B., & Frost, S. (1994). Catalase activity in wastewater. *Water Research*, 28(2), 497–500. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90289-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90289-5)
- Yin, J., Cui, J. Y., Li, J. N., & Wang, J. X. (2013). Mathematical model for the factors affecting catalase activity in activated sludge. *Applied Mechanics and Materials*, 409–410, 152–155. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.409-410.152>
- Lv, Z., Yao, Y., Lv, Z., & Min, H. (2008). Effect of tetrahydrofuran on enzyme activities in activated sludge. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(2), 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.001>
- Siddique, N. I., & Wahid, Z. A. (2012). Application of chemical and biological coupled treatment technology in POMIE and petroleum waste water as biodegradation alternative. *Journal of Environmental Science and Technology*, 5(3), 155–167. <https://doi.org/10.3923/jest.2012.155.167>

RESEARCH OF THE CATALASE ACTIVITY OF ACTIVATED SLUDGE

M. Puodžiūnaitė, A. Mažeikienė

Summary

The biochemical activity of activated sludge is assessed by the amount of enzymes in the activated sludge. Enzymatic (catalase) activity studies are related to water or wastewater treatment. The aim of this work is to measure the activity of catalase in activated sludge samples and to find the relationships between the catalytic activity of activated sludge and wastewater treatment indicators. After titrimetric catalase activity test dependencies were found between the catalase activity of activated sludge and wastewater treatment indicators. A strong polynomial relationship ($R^2 = 0.99$) was observed between catalase activity and biochemical oxygen demand of treated wastewater, a strong logarithmic relationship was observed between catalase activity and ammonium nitrogen ($R^2 = 0.98$) and a strong polynomial relationship was observed between catalase activity and nitrate nitrogen ($R^2 = 0.87$).

Keywords: activated sludge, catalase, wastewater treatment indicators, biological wastewater treatment.