

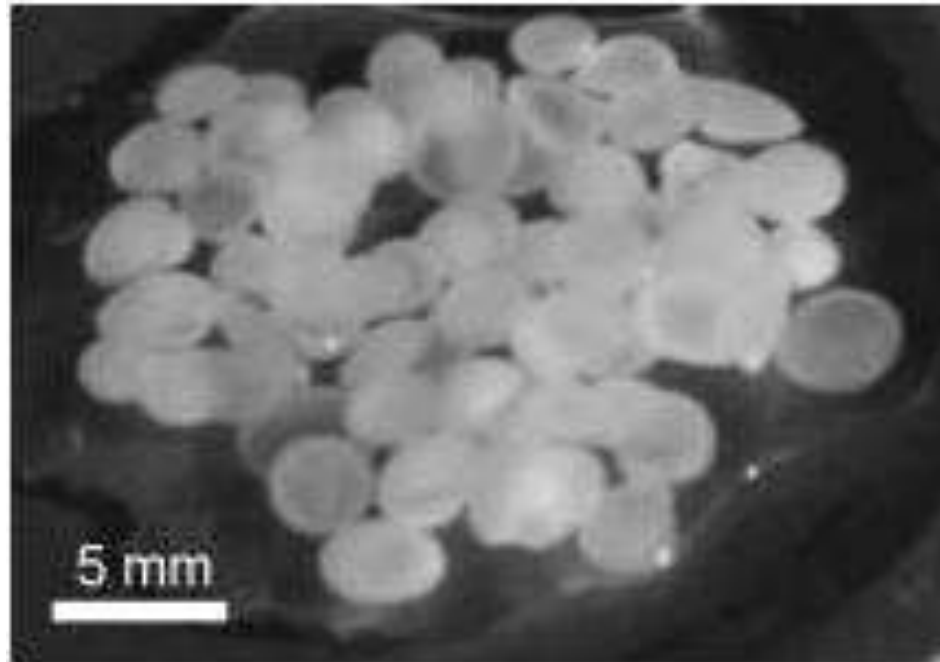
# Odstraňování dusičnanů a dusitanů ze zasolených vod pomocí denitrifikačních Biokatalyzátorů lentikats

J. Trögl, A. Boušková, V. Pilařová, P. Dáňová,  
J. Mrákota, J. Měchurová, J. Krudencová, R. Holíček,  
R. Fryčák, S. Bošková, P. Janoš, R. Stloukal



# Biotechnologie lentikats

- **Biokatalyzátor Lentikats** = biologický materiál enkapsulovaný do polyvinylalkoholové matrice (PVA) do tvaru čoček

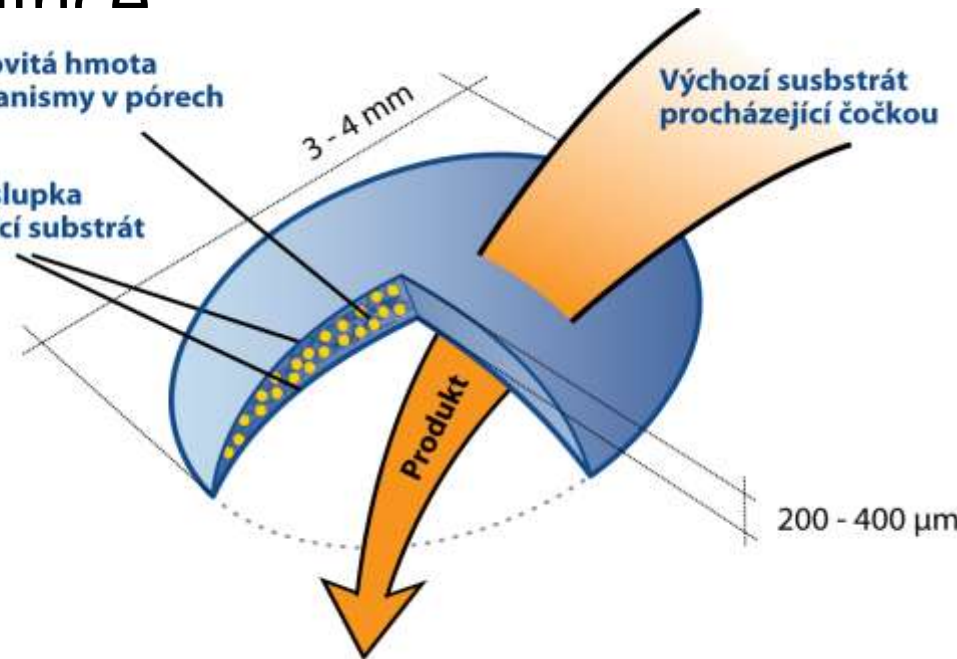


# Biotechnologie lentikats

- Hydrogel (~80% vody)
- Pružná, ale pevná matrice
- Netoxická
- Biologicky neodk
- Dlouhodobě sta
- Rychlá difúze

Uvnitř pórovitá hmota  
s mikroorganismy v pórech

Povrchová slupka  
propouštějící substrát



# Biotechnologie lentikats

- **Biotechnologie lentikats** = jakákoliv biotechnologie využívající Biokatalyzátor lentikats®
- **Výhody**
  - Dávkování MO dle potřeby
  - Opakované použití
  - Ochrana mikroorganismů
  - Vysoká aktivita pomalurostoucích MO
  - Snížení produkce kalů
  - Intenzifikace provozu

# Řešené projekty

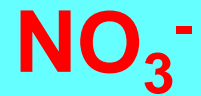
- **Odstranění dusičnanů z eluátů iontoměničových kolon**
  - 20 g/l NaCl + 2 g/l Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, až 10 g/l NO<sub>3</sub><sup>-</sup>
  - bez živin
- **Odstranění dusičnanů a dusitanů z OV po odsíření spalin**
  - salinita až 8% (35 g/l Cl<sup>-</sup> + 17 g/l SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)
  - až 250 mg/l N-NO<sub>x</sub><sup>-</sup>
  - limitující živiny (P...)
  - vysoká CHSK (400-1400 mg/l) nízká BSK<sub>5</sub>



# Experimentální podmínky

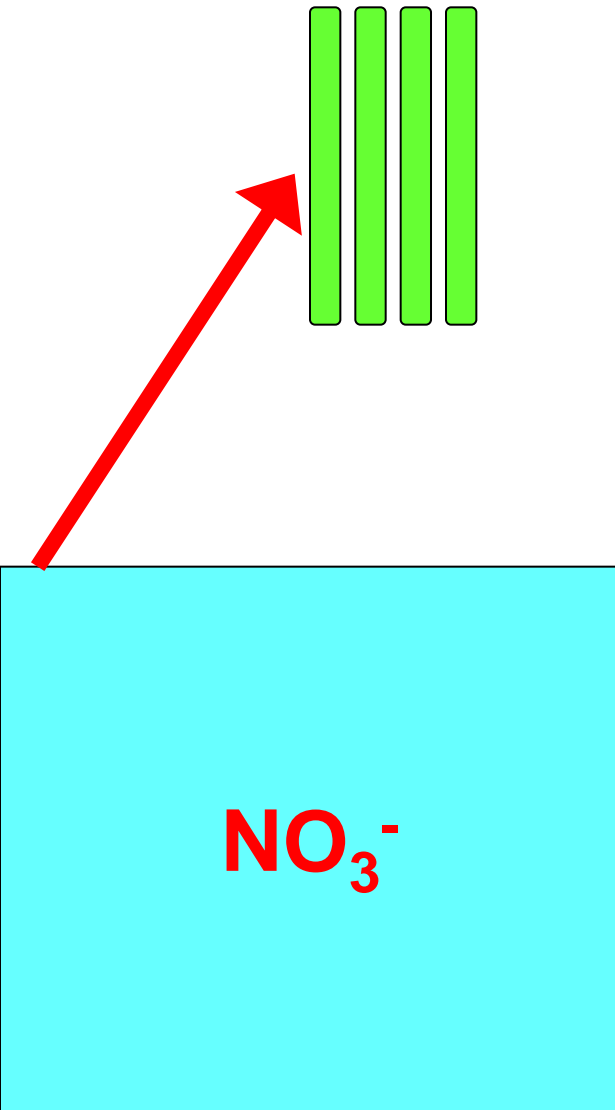
- Org. substrát ethanol, Brentaplus
  - 3:1 až 8:1 (CHSK:N)
- Biokatalyzátory lentikats
  - *Paracoccus denitrificans*
  - *Paracoccus pantotrophus*
  - *Pseudomonas fluorescens*
- Na úvod anoxická kultivace na aktivitu  
~1000 mg N / hod / kg BL

# Eluáty iontoměničových kolo

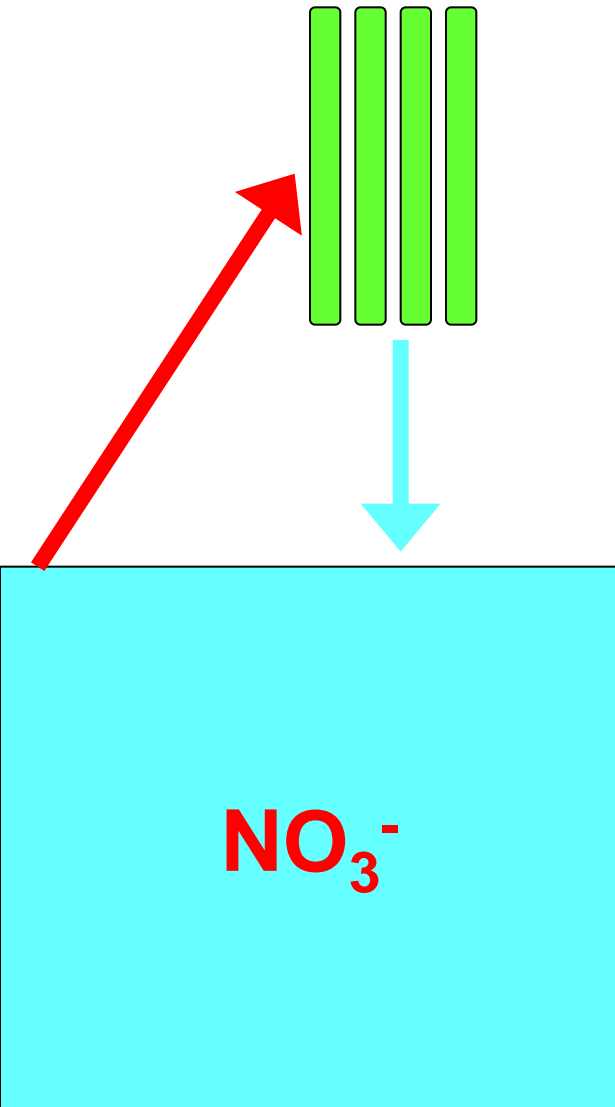




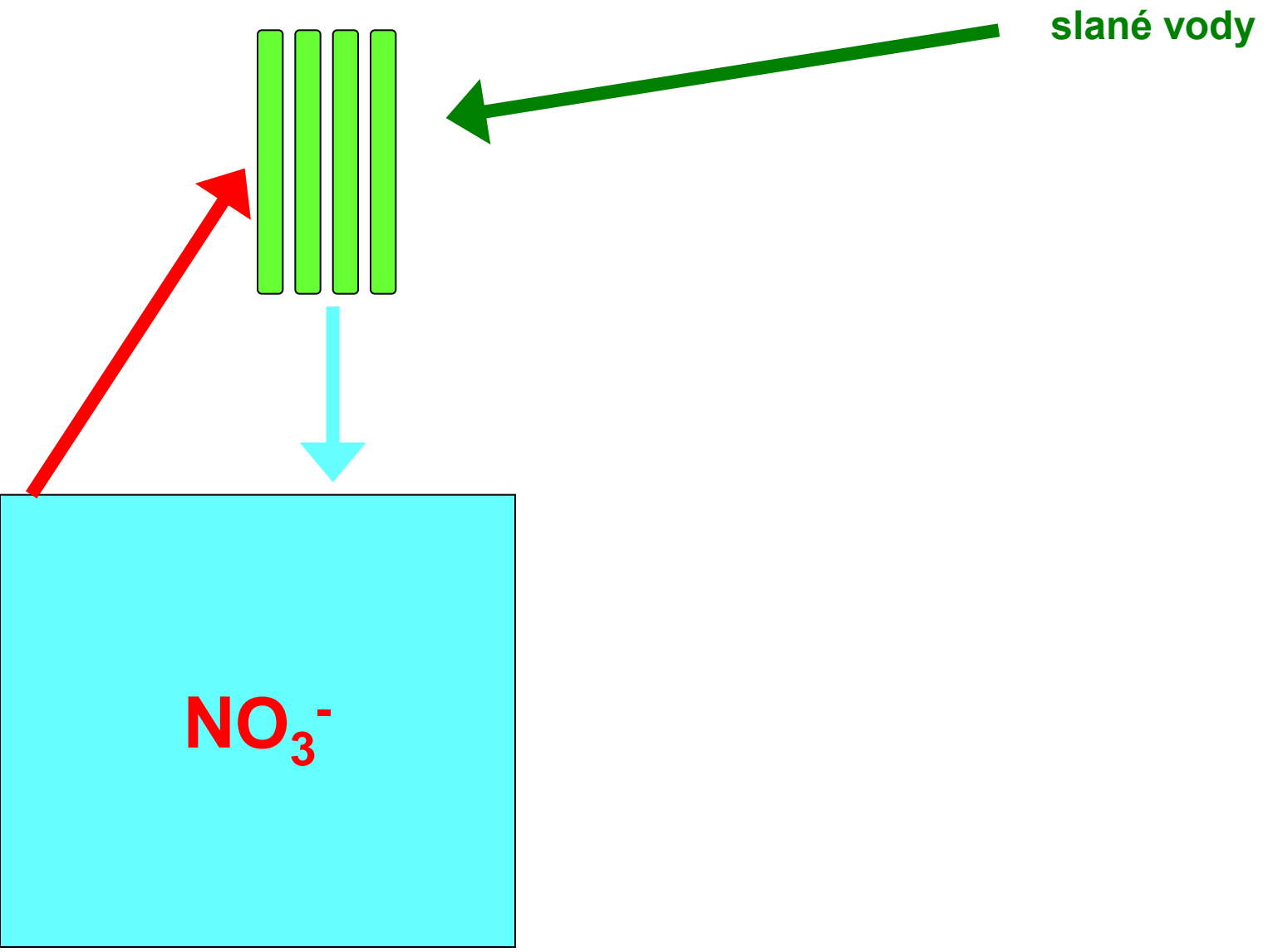
# Eluáty iontoměničových kol



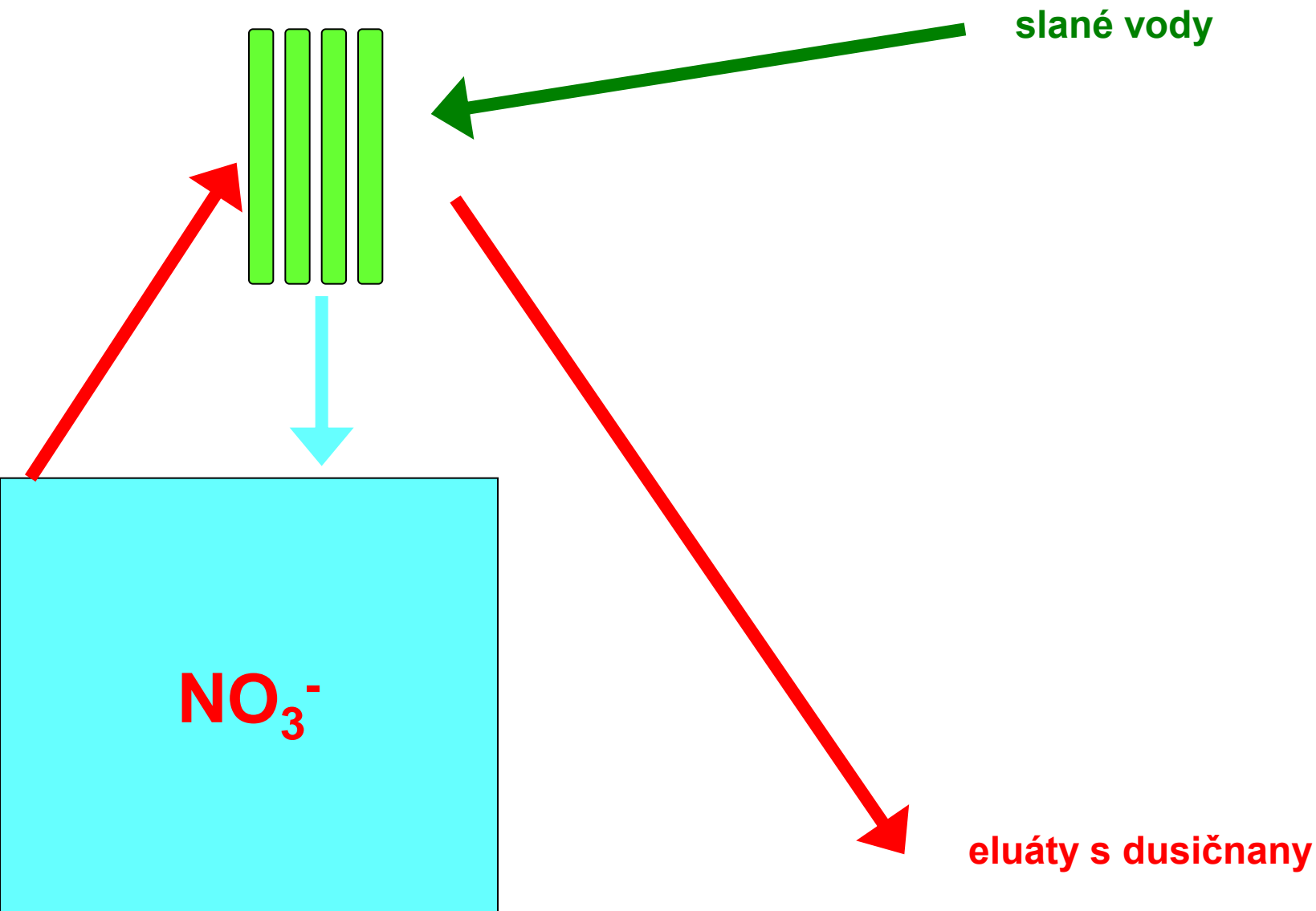
# Eluáty iontoměničových kol



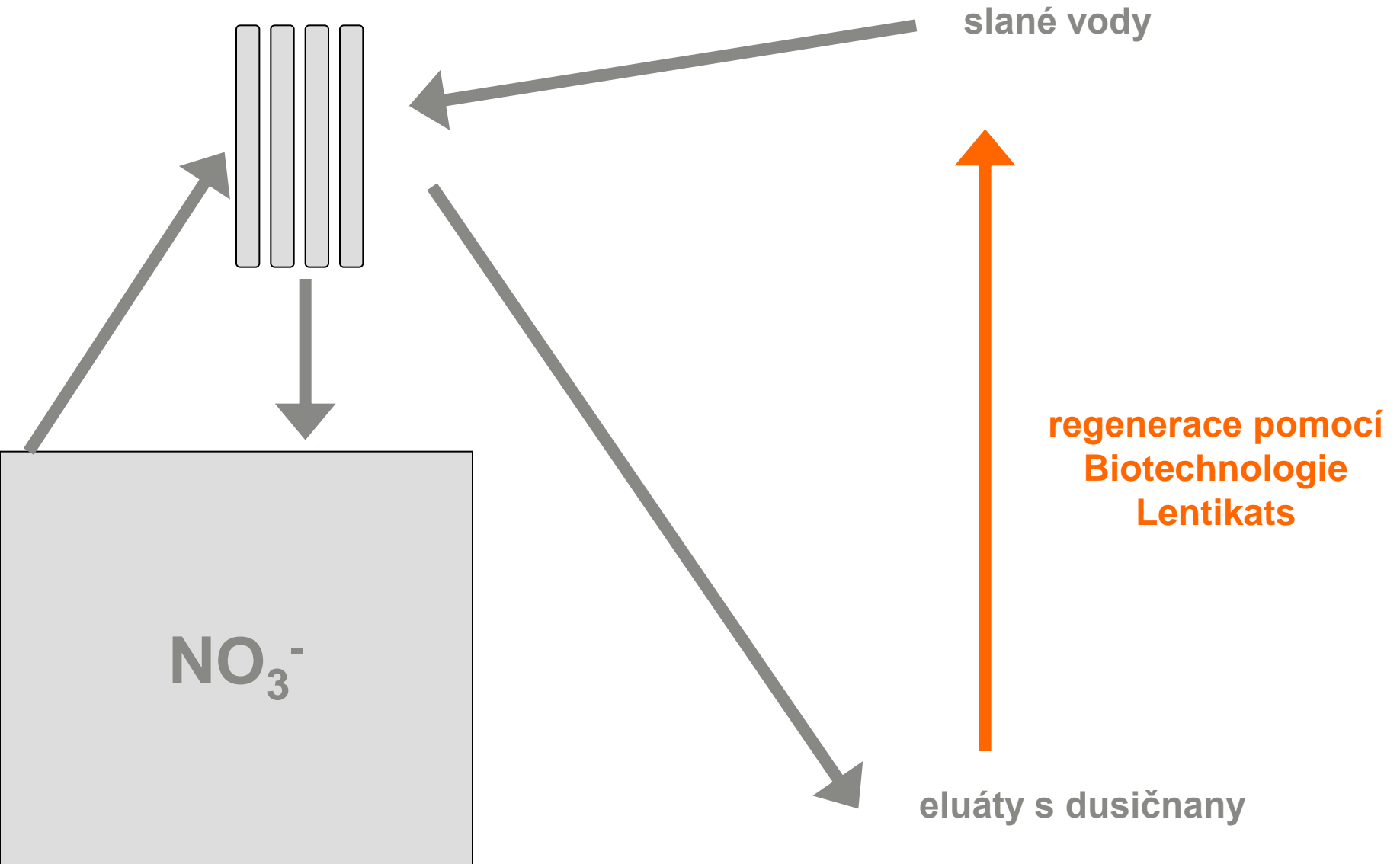
# Zadání



# Zadání



# Eluáty iontoměničových kol



# Eluáty iontoměničových kolon

- **Cíl:** Optimalizovat Biotechnologii Lentikats pro odstraňování dusičnanů z eluátů iontoměničových kolon
  - maximální aktivita BL ( $\text{mg N-NO}_3 / \text{hod} / \text{kg BL}$ ) - otázka výsledného objemu reaktoru a množství BL
- Potenciální problémy: salinita, absence živin, vysoké koncentrace  $\text{NO}_3^-$

# Vsádkové pokusy

- Hlavní faktory ovlivňující denitrifikační aktivity
  - teplota (22-30 C)
  - doba od poslední kultivace enkapsulovaných MO
    - bakterie se nemnoží (absence živin), ale postupně umírají a unikají z PVA matrice
    - nutná regenerace (kultivace)

# Vsádkové pokusy

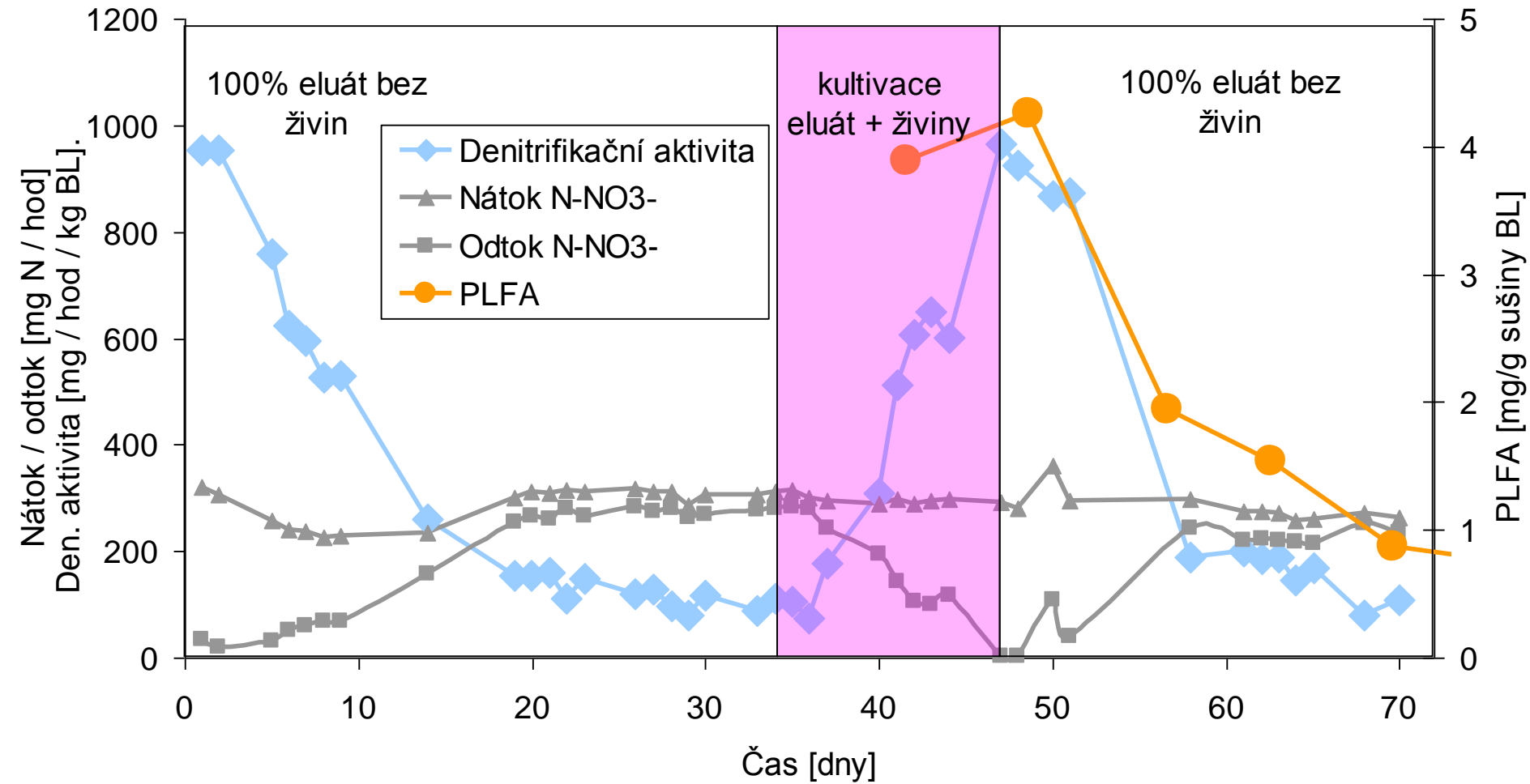
- Po **adaptaci** nemá vliv ředění matrice
  - lze dosáhnout až 1000 mg N / hod / kg BL
    - srovnatelné s neinhibujícím denitrifikačním médiem
  - adaptace po min. jednom cyklu **eluáty** (pokles aktivity) – **kultivace** (kultivace přeživších MO)
  - pravděpodobně selekce odolnějších jedinců



# Průtočné pokusy

- Dlouhodobé ověření předchozích poznatků
- Ověření poklesu aktivit a kultivace v průtočném uspořádání
- Denitrifikační aktivity přes 400 mg N / hod / kg BL, s adaptovaným BL přes 1000

# Adaptovaný BL



# Aplikační souhrn

- BL aplikovatelný pro denitrifikaci eluátů iontoměničových kolon
  - Po adaptaci **vysoké denitrifikační aktivity** (1000 mg N / hod / kg BL)
  - Lze odbourávat **až 10 g/l NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** (průtočně) resp. 8 g/l (vsádkově)
  - Účinnost odbourání N **>98%**
  - Pokles aktivity v důsledku absence živin
    - regenerace možná vsádkově i průtočně



## Cíle:

- Změřit a zredukovat inhibici denitrifikace v **reálných vodách** z běžících elektráren
- Dlouhodobě ověřit provoz v průtočném uspořádání
- Optimalizovat provoz (pH, CHSK:N, doba zdržení...)

# Vsádkové porovnání biokatalyzátorů

Salinita ~4%	Aktivita odbourávání [mg N-NO <sub>x</sub> /(kg BL·hod)]		
	<b>N-NO<sub>x</sub></b> <b>N-NO<sub>3</sub></b>		
Biokatalyzátor	Počáteční aktivita v KM médiu	Aktivita v upravené odpadní vodě	Aktivita v KM po experimentu s OV
<i>P. pantotrophus</i>	<b>467 16 (100 %)</b> 805 209 (100 %)	<b>79 8 (17 %)</b> 192 15 (24 %)	<b>293 8 (63 %)</b> 363 92 (45 %)
<i>P. fluorescens</i>	<b>322 50 (100 %)</b> 420 149 (100 %)	<b>55 6 (17 %)</b> 202 74 (48 %)	<b>236 82 (73 %)</b> 229 63 (54 %)
<i>P. fluorescens</i> , + fosfor	<b>310 104 (100 %)</b> 365 28 (100 %)	<b>201 62 (65 %)</b> 384 119 (105 %)	<b>386 60 (125 %)</b> 409 60 (112 %)

# Vsádkové porovnání biokatalyzátorů

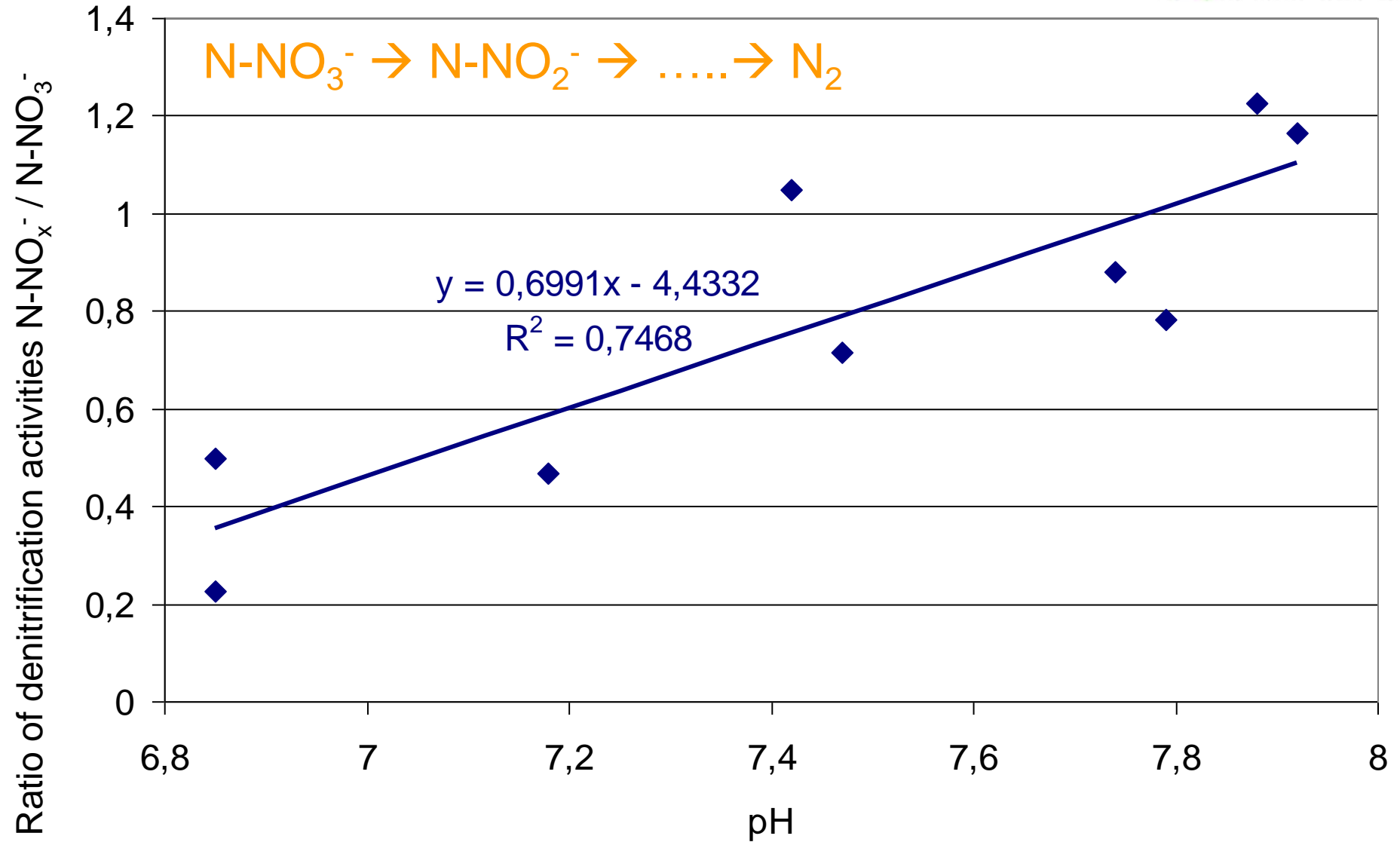
Salinita ~4%	Aktivita odbourávání [mg N-NO <sub>x</sub> /(kg BL·hod)]		
	<b>N-NO<sub>x</sub></b> <b>N-NO<sub>3</sub></b>		
Biokatalyzátor	Počáteční aktivita v KM médiu	Aktivita v upravené odpadní vodě	Aktivita v KM po experimentu s OV
<i>P. pantotrophus</i>	467 16 (100 %) 805 209 (100 %)	79 8 (17 %) 192 15 (24 %)	293 8 (63 %) 363 92 (45 %)
<i>P. fluorescens</i>	322 50 (100 %) 420 149 (100 %)	55 6 (17 %) 202 74 (48 %)	236 82 (73 %) 229 63 (54 %)
<i>P. fluorescens</i> , + fosfor	310 104 (100 %) 365 28 (100 %)	201 62 (65 %) 384 119 (105 %)	386 60 (125 %) 409 60 (112 %)



# Průtočné pokusy

	Nátok			Dosažené parametry		
Time [days]	Cl <sup>-</sup> [g/l]	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> [g/l]	N-NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> [mg/L]	Odtok N-NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> [mg/l]	Denit. aktivita [mg N-NO <sub>x</sub> <sup>-</sup> ·h <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> BL]	Pozn.
16.83	20	10.5	200	<5	>456	
43.99	35	17	248	157	201	
47.32	35	17	132	42	192	
47.91	35	17	80	<5	>167	
51.80	35	17	114	21	212	Doba zdržení 8 h
76.12	20	3.5	203	23	407	
88.08	20	3.5	97	19	187	
90.06	5	3.5	76	5	171	
98.82	5	3.5	157	<5	>479	+ živiny
101.82	5	3.5	206	<5	>477	

# Vliv pH





- Biotechnologie lentikats je použitelná pro eliminaci  $\text{N-NO}_x^-$  z vod po odsíření spalin
  - aktivity snižené dle salinity ( $150\text{-}450 \text{ mg N. h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  LB), ale stále dostatečné pro průmyslovou aplikaci
  - účinnost odstranění  $\text{N-NO}_x^-$  ( $>98\%$ )
  - nízké odtokové koncentrace  $\text{N-NO}_x^-$  ( $<5 \text{ mg/L}$ )
- Přídavky fosforu snižují inhibici denitrifikace
- Je třeba přidávat průběžně živiny pro dlouhodobé udržení aktivity
- pH přes 7,8 eliminuje kumulaci dusitanů

- **Klíčový** význam enkapsulace při podobných aplikacích
  - Udržení biomasy v systému i při nedostatku / absenci živin
  - Použitelné denitrifikační aktivity i při extrémních salinitách
  - Eliminace i vysokých (inhibujících) koncentrací N-NO<sub>x</sub><sup>-</sup> (2300 mg/l)
  - Ochranný vliv matrice?
  - Adaptace enkapsulovaných MO?



# Aplikační souhrn eluáty

- Životnost BL nejméně 1 rok
- Vsádkové i průtočné uspořádání srovnatelné (aktivity, pokles)
  - vsádkově lze lépe kontrolovat stupeň odstranění
  - průtočně lze odbourávat vyšší koncentrace  $\text{NO}_3^-$

# Experimentální část

- **Reaktor**

- kádinky 5l (pracovní objem 3-4 litry)
- válcovitý 15 litrů (pracovní objem 10 l)
- míchání (→ vzos BL)
- sondy pH, O<sub>2</sub>, teplota
- průtočné uspořádání: peristaltické pumpy, síťový separátor

# Experimentální část

- **Analytická stanovení**
  - **dusičnany**, chloridy, sírany (HPLC)
  - **dusitany**, fosforečnany, amonné ionty, CHSK (spektrofotometricky – sety Merck)
  - zákal (OD) - spektrofotometricky
  - RL, NL – po filtraci přes 0,45 $\mu$ m filtr

# Validace analytických stanovení

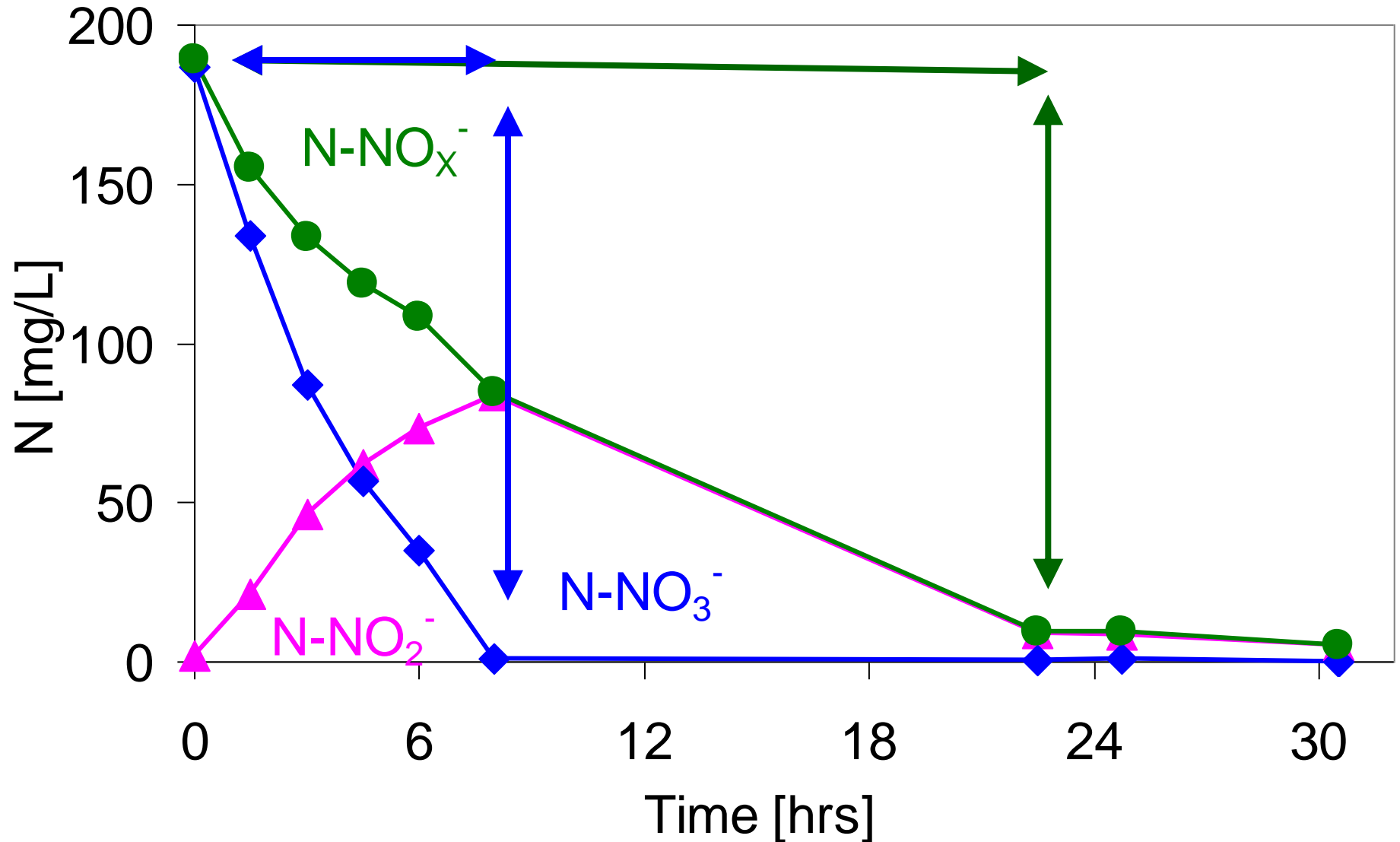
- Stanovení dusitanů a CHSK **validována**
  - interference chloridů, síranů, dusičnanů, dusitanů
- Ostatní stanovení orientační kontrola
- **Závěr:** Vzorky je třeba ředit 20x-50x
- Vyšší meze stanovitelnosti
  - dusičnany 25 mg/l
  - dusitany 2,5 mg/l
  - CHSK 100 mg/l

# Aktivita BL

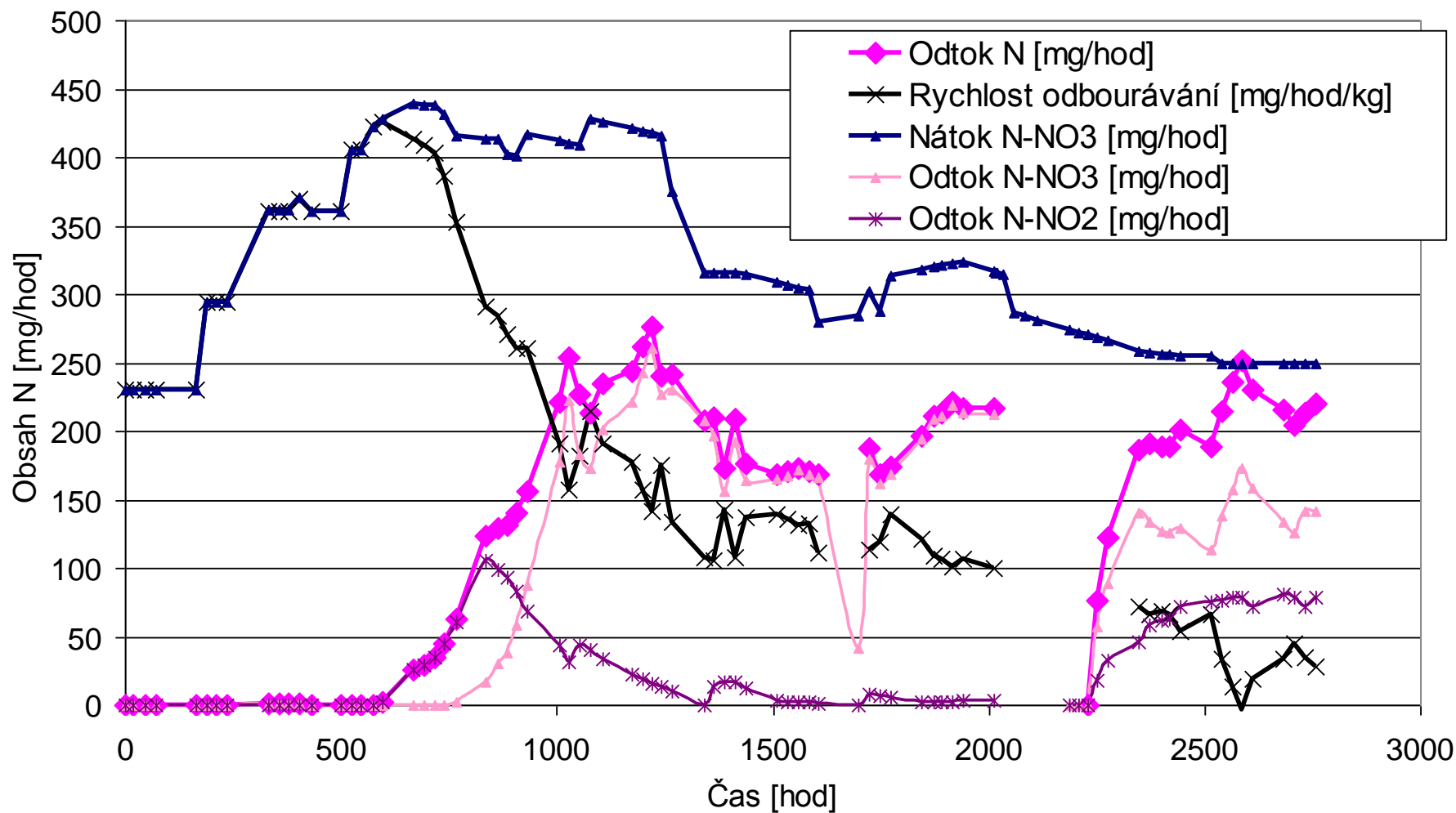
- = rychlost odbourávání jednotkovým množstvím BL
  - odbouraný N-NO<sub>x</sub> / hod / kg BL
- **Vsádkově**: z počátečního N-NO<sub>x</sub> a doby pro jeho odbourání pod mez stanovitelnosti
- **Kontinuálně**: rozdíl mezi nátokem a odtokem N (mg N/hod)
- Analogicky i další aktivity (N-NO<sub>3</sub>, CHSK, P...)



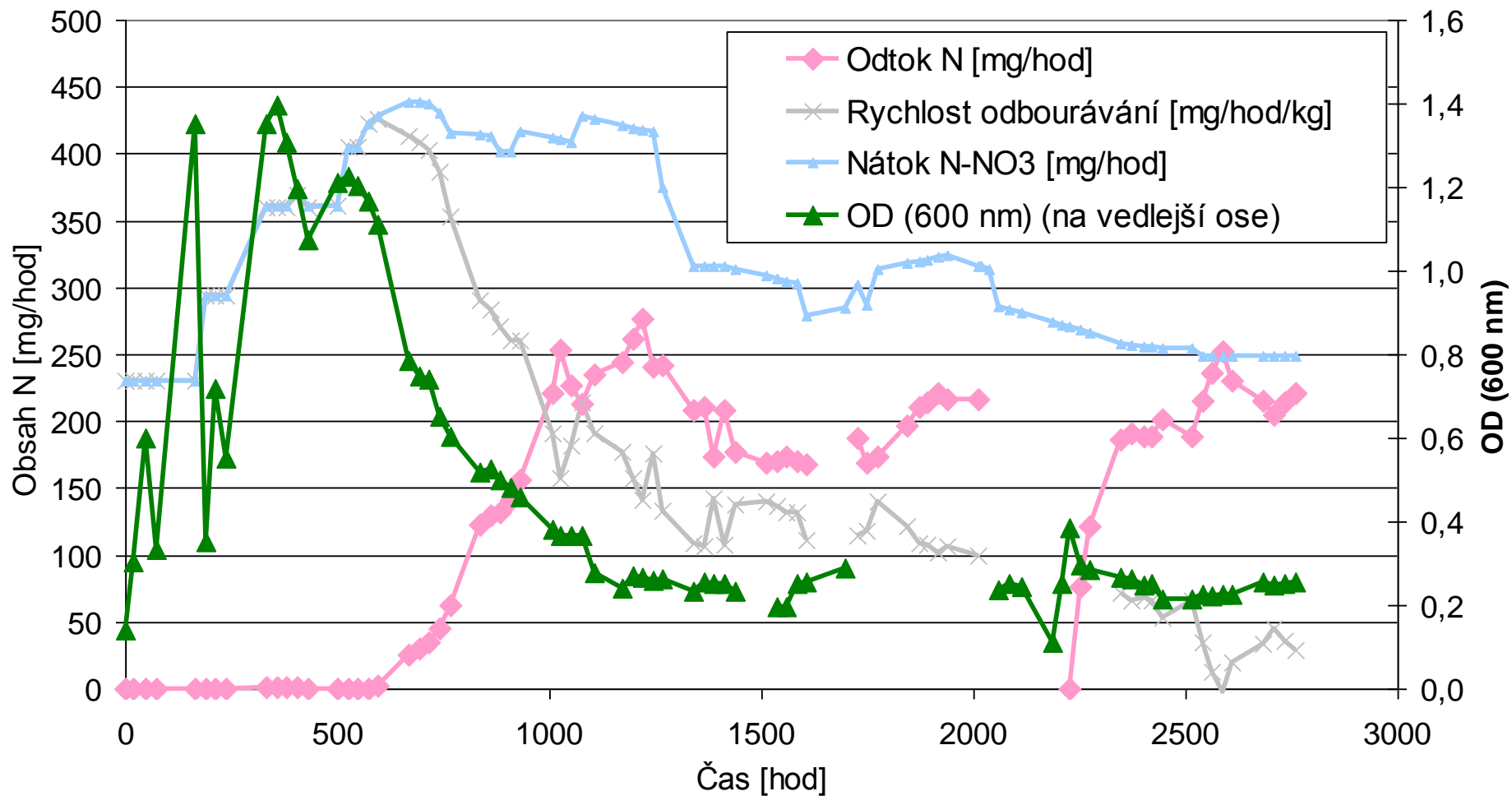
# Denitrification activity



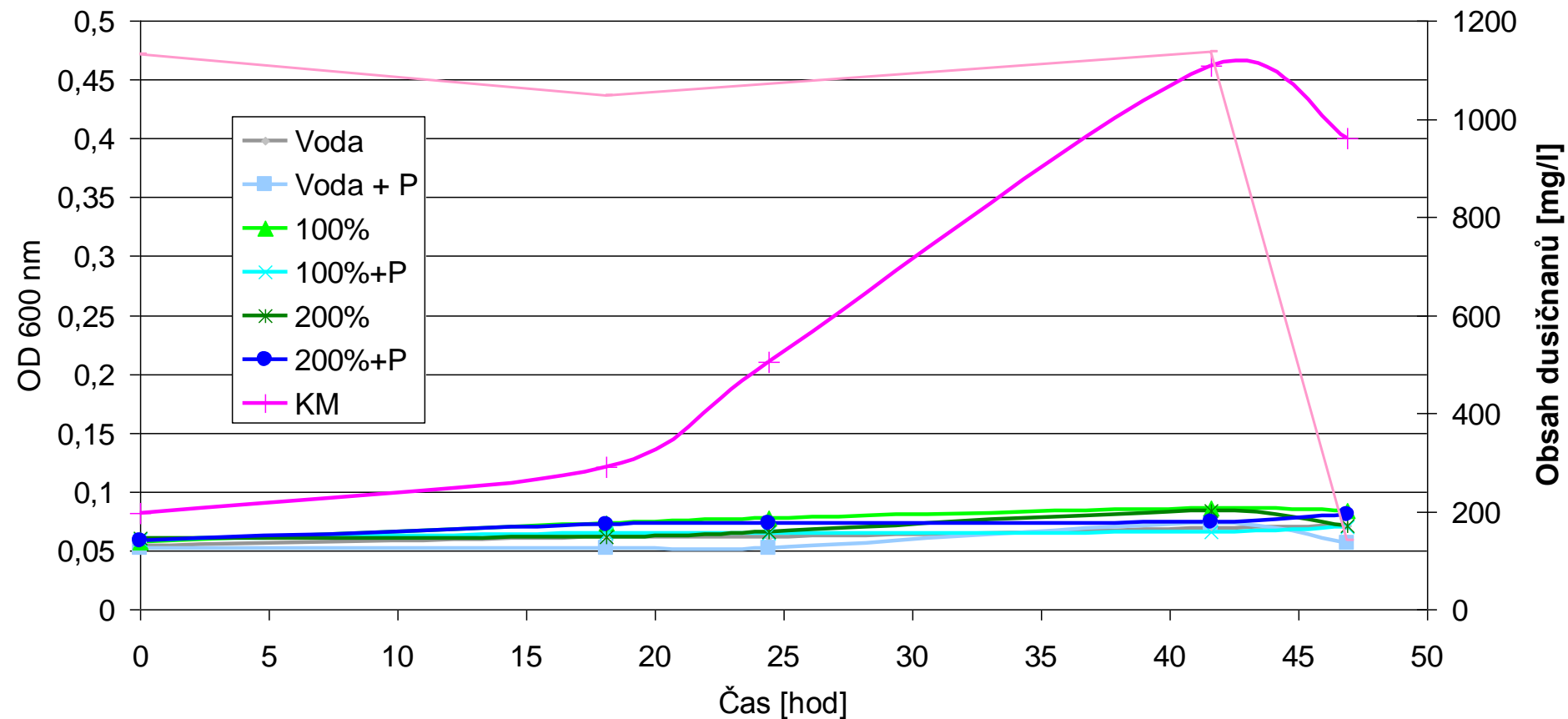
# Pokus 79



# Pokus 79

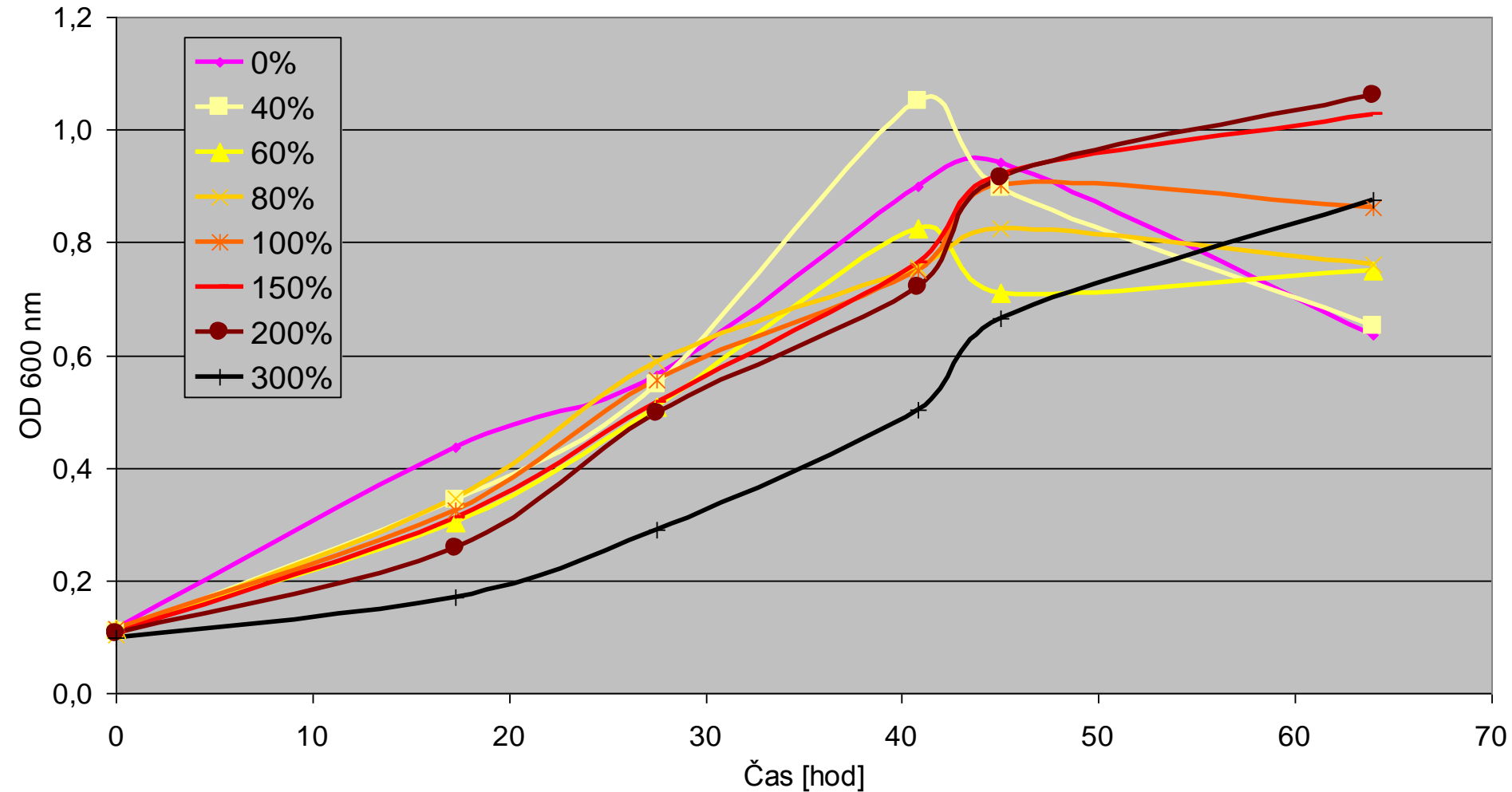


# Růstová křivka volného *P. denitrificans*



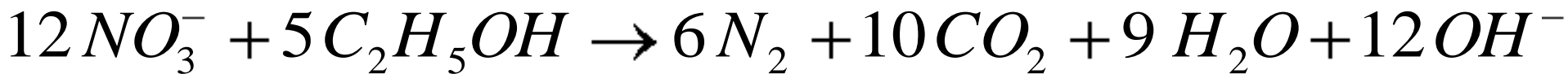
Generační doba = 12,2 hod

# Růstová křivka *P. denitrificans* v živném médiu s přidavkem solí



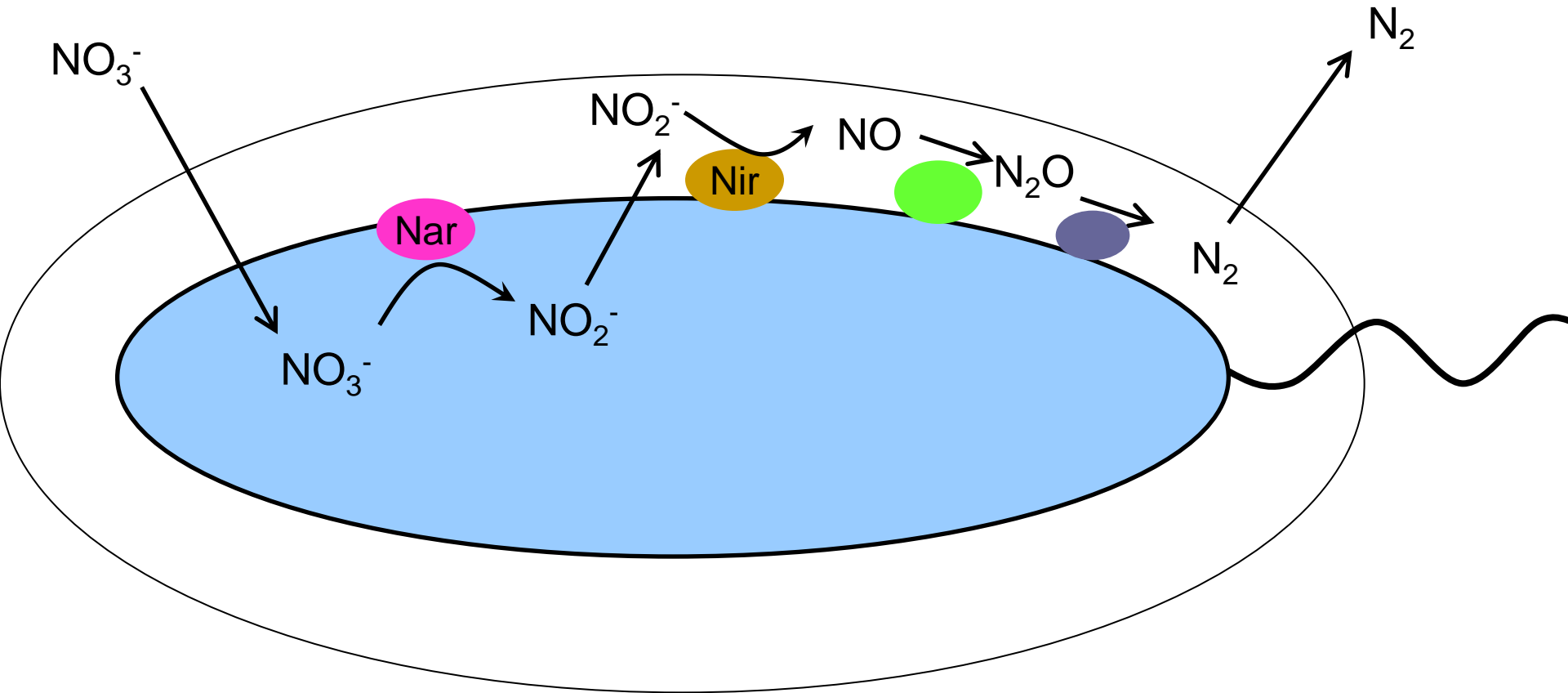
# Denitrifikace

- **Mikrobiální** redukce dusičnanů na dusitany až plynný dusík – **anaerobní respirace**
  - *Paracoccus, Pseudomonas...*



- Několik meziproductů
- $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$
- Různá buněčná lokalizace (cytoplazma, periplazmatický prostor)

# Denitrifikace – buněčná lokalizace



# Inhibice denitrifikace

- **Hlavní faktory**

- salinita
- vysoké koncentrace dusičnanů
- vyšší koncentrace dusitanů ( $\text{HNO}_2$ )
- kyslík
- těžké kovy

- Významný vliv pH

- kyselé prostředí = vyšší toxicita dusitanů
- vliv pH na poměr mezi odbouráváním dusičnanů a dusitanů (vyšší pH = priorita



# Adaptace

- V předchozích pokusech pozorována adaptace
  - **fyziologická**: nestandardní kinetika u prvních pokusů v eluátech (šok?)
  - **dlouhodobá** (evoluční?): zvyšování aktivit s opakovanými cykly eluáty-kultivace
- Obojí znovu pozorováno