

VYUŽITÍ BIOLOGICKÉ NITRIFIKACE PRO ODSTRANĚNÍ AMONIAKÁLNÍHO DUSÍKU Z DŮLNÍCH VOD

EVA POLÁKOVÁ, NINA STRNADOVÁ,
HANA STRYJOVÁ a MARTIN PEČENKA

Ústav technologie vody a prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha
eva.polakova@vscht.cz, nina.strnadova@vscht.cz,
hana.stryjova@vscht.cz, martin.pecenka@vscht.cz

Došlo 2.5.12, přijato 1.9.12.

Klíčová slova: nitrifikace, nitrifikační bakterie, amoniakální dusík, dusitany, dusičnany, důlní voda

Úvod

Důlní vody se řadí mezi průmyslové odpadní vody a při jejich vypouštění do vod povrchových musí být splněny podmínky uvedené v nařízení vlády 61/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů (cit.¹). Pro důlní vody ve zmíněném nařízení nejsou pro jednotlivé ukazatele kvality stanoveny emisní limity, pouze emisní standardy a tzv. normy environmentální kvality vyjádřené jako celoroční průměrné hodnoty pro útvary povrchových vod. Vodohospodářský orgán však stanovuje emisní limity pro vypouštění důlních vod individuálně, maximálně do výše emisních standardů².

Znečištění důlních vod je především anorganického původu, přičemž problém většinou způsobují vysoké koncentrace železa, manganu, amoniakálního dusíku (N_{amon}), síranů a v důsledku toho i vysoké koncentrace rozpuštěných látek. Ze zmíněných ukazatelů je v provozních podmínkách problematické odstraňování zejména N_{amon} a síranů. Pro efektivní odstraňování železa a manganu většinou postačuje alkalizace vody vápenným mlékem na hodnoty pH cca 8,5 a vyšší. V článku je proto pozornost zaměřena na možné způsoby odstranění N_{amon} z důlních vod. Odstraňování N_{amon} je významné pro následné zaústění důlních vod do vod povrchových, kde v závislosti na hodnotě pH a teplotě vody může docházet k disociaci amonných iontů na volný amoniak, který je již ve velmi nízkých koncentracích toxický pro ryby³.

Odstraňování amoniakálního dusíku

N_{amon} je ve vodách za oxických podmínek nestálý a velmi snadno podléhá biochemické oxidaci (nitrifikaci)⁴. Biologická nitrifikace je nejběžněji používaný proces odstraňování N_{amon} z odpadních vod a probíhá za aerobních podmínek. Je možné říci, že aerace představuje

v uvedeném procesu nejvyšší provozní náklady⁵. Přesto je biologické čištění relativně levné a nevytváří se při něm žádné nežádoucí vedlejší produkty⁶. Nitrifikace probíhá dvoustupňově: v prvním kroku je N_{amon} oxidován na dusitany za účasti bakterií oxidujících amoniak, v druhém kroku dochází k oxidaci dusitanů na dusičnany za přítomnosti bakterií oxidujících dusitany. Nitrifikační mikroorganismy jsou Gram-negativní autotrofní mikroorganismy využívající jako zdroj uhlíku formy oxidu uhličitého⁷. Při chemické reakci biologické nitrifikace se uvolňují vodíkové ionty, které se podílí na snížení hodnoty pH. Současně se snižuje hodnota kyselinové neutralizační kapacity ($KNK_{4,5}$)⁴. Rozmezí hodnot pH pro biologickou nitrifikaci je 6,45–8,95 (cit.⁵).

Experimentální část

Laboratorní testy zaměřené na využití biologické nitrifikace pro odstraňování N_{amon} z důlních vod byly prováděny s reálnou důlní vodou (viz tab. II), ve které byly přítomny vysoké koncentrace především manganu, železa, amoniakálního dusíku a síranů.

Provozní podmínky biologického reaktoru

Nitrifikační reaktor o celkovém objemu 4 l byl provozován jako vsádkový a byl naplněn 3 l aktivovaného kalu z biologické čistírny odpadních vod. Sušina kalu v reaktoru byla 2,74 g l⁻¹, přičemž 76 % tvořil organický a 24 % anorganický podíl. Reaktor byl vybaven lopatkovým míchadlem a byla zajištěna jemnobublinná aerace.

Pro zapracování systému (vytvoření dostatečné koncentrace biomasy nitrifikačních bakterií) byla jako substrát použita syntetická odpadní voda, která byla připravena rozpuštěním chloridu amonného (koncentrace N_{amon} 16 mg l⁻¹) a dihydrogenfosforečnanu draselného (koncentrace $P-PO_4^{3-}$ 3 mg l⁻¹) ve vodovodní vodě. Adaptace systému probíhala 10 dní. Ve 24hodinových intervalech byly z reaktoru (vždy po odsazení kalu) odebrány 2 l odsazené vody, přidány 2 l čerstvé syntetické odpadní vody a byla upravena hodnota pH pomocí roztoku NaOH na cca 7,0 až 7,5.

Kinetické testy

Pro zjištění účinnosti biologické nitrifikace byl následně proveden test s reálnou důlní vodou místo vody syntetické. Podmínky byly zcela shodné jako při adaptaci systému.

Byly provedeny dva kinetické testy.

1. test (24hodinový) byl proveden s adaptovaným aktivovaným kalem po 3 dnech provozu reaktoru s reálnou důlní vodou.

Po ukončení 1. testu byl do reaktoru přidán nosič biomasy ve formě molitanových krychlíček o hraně 1 cm (hmotnost přidaného suchého nosiče byla 5 g), za účelem předpokládané intenzifikace procesu kultivací nárostové

kultury nitrifikačních mikroorganismů. Použitím nosiče biomasy dochází ke zvýšení hodnoty stáří kalu, což je pro nitrifikační organismy příznivé.

2. test byl pak proveden po 8 dnech od výše uvedeného přidání nosiče biomasy. Test probíhal pouze 15 hodin. Tato doba se po vyhodnocení 1. testu jevila jako dostatečná.

Metodiky analytických stanovení

Koncentrace amoniakálního, dusitanového, dusičnanového dusíku a fosforečnanového fosforu byla stanovena ve filtrátu metodou absorpční spektrofotometrie. Amoniakální dusík reakcí s Nesslerovým činidlem, dusitany reakcí s činidlem SANED (aminobenzensulfonamid, dihydrochlorid *N*-(1-naftyl)-1,2-diaminoethanu a kyselina fosforečná), dusičnany přímým měřením v ultrafialové oblasti spektra při 210 nm a fosforečnany reakcí s heptamolybdenanem amonným, vinanem antimonylo-draselným a kyselinou askorbovou v kyselém prostředí⁸.

Metodika fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) pro stanovení nitrifikačních bakterií

Odběr, fixace a hybridizace vzorků

Reaktor byl po ukončení 2. testu dále provozován. Vzorky kalu odebrané z nitrifikačního reaktoru po dvou týdnech od ukončení 2. testu byly zafixovány 4% paraformaldehydem. Homogenizovaný vzorek byl nanesen na sklíčko, po zaschnutí byl zhybridizován s komplementárními sondami k 16S rRNA (ribosomální RNA) sekvencím zkoumaných mikroorganismů, jejich přehled a charakteristiky jsou uvedeny v tab. I.

Pro zvýšení pozitivního signálu byly kombinovány sondy NSO1225 a NSO190 (NSO_{mix}) a sonda Ntspa662 se sondou Ntspa712 (Ntspa_{mix}). Nejprve byla provedena hybridizace vzorku se sondou NSO190 (50% FA) a poté se sondou NSO1225 (35% FA). Při použití sond NEU, Ntspa662, Ntspa712 a NIT3 je vyžadována aplikace kompetitoru (fluorescenčně neznačený nukleotid, který zabráňuje nespecifickému vázání genové sondy tím, že se váže

Tabulka I
Přehled použitých sond⁷

Stanovená individua (skupina)	Název sondy	FA (formamid) [%]
<i>Betaproteobacteria</i> nitrifikační	NSO1225	35
<i>Betaproteobacteria</i> nitrifikační	NSO190	50
většina halofilních a halotolerantních <i>Nitrosomonas</i>	NEU	40
rod <i>Nitrospirae</i>	Ntspa662	35
kmen <i>Nitrospirae</i>	Ntspa712	35
rod <i>Nitrobacter</i>	NIT3	40

přednostně na místo podobné sekvence jako cílové). Všechny sondy byly značené barvivem Cy3.

Výsledky a diskuse

Složení důlní vody pro 1. test (bez nosiče) a 2. test (s nosičem) je uvedeno v tab. II, koncentrace N_{amon} byla cca 10 mg l⁻¹.

Test bez nosiče biomasy

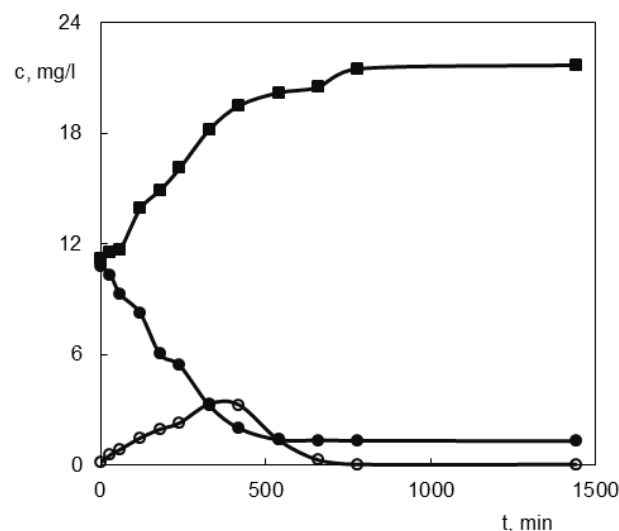
Průběh 24hodinového prvního kinetického testu je znázorněn na obr. 1.

Nitrifikace měla klasický průběh. Koncentrace dusitanů stoupala až do 330. minuty, poté začala klesat a v 780. minutě byla téměř nulová. Koncentrace N_{amon} od počátku testu postupně klesala a koncentrace dusičnanů naopak vzrůstala v průběhu celého testu. V prvním kinetickém testu (bez nosiče biomasy) bylo dosaženo účinnosti odstranění N_{amon} 88 % při 11hodinové době zdržení reálné důlní vody v reaktoru. Pokračování testu dalších 13 hodin nevedlo již k výraznému úbytku N_{amon} . Součet jednotlivých forem dusíku ($N-NO_2^- + N-NO_3^- + N_{amon}$) byl v průběhu testu konstantní a pohyboval se okolo 23 mg l⁻¹. Sušina kalu byla 430 mg l⁻¹ (81 % organický a 19 % anorganický podíl).

Test s nosičem biomasy

Průběh 15hodinového druhého kinetického testu je znázorněn na obr. 2.

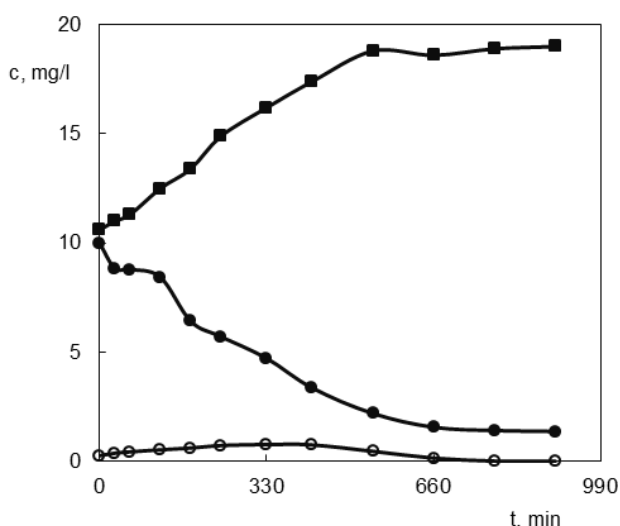
Metodika 2. testu byla upravena zkrácením doby zdržení na 15 hodin na základě poznatku z 1. testu. Koncen-



Obr. 1. Kinetika nitrifikace bez nosiče biomasy; ● N_{amon} , ○ $N-NO_2^-$, ■ $N-NO_3^-$

Tabulka II
Složení důlní vody

Ukazatel	Jednotka	1. test	2. test
pH	–	7,3	7,1
KNK _{4,5}	mmol l ⁻¹	7,29	7,00
ZNK _{8,3}	mmol l ⁻¹	0,70	1,4
Ca+Mg	mmol l ⁻¹	10,1	9,70
N _{amon}	mg l ⁻¹	10,8	10,0
N-NO ₂ ⁻	mg l ⁻¹	0,13	0,26
N-NO ₃ ⁻	mg l ⁻¹	11,2	10,6
P-PO ₄ ³⁻	mg l ⁻¹	1,02	1,17
Cl ⁻	mg l ⁻¹	48,3	49,4
SO ₄ ²⁻	mg l ⁻¹	832	850
NL	mg l ⁻¹	27	18
Fe _{celk.}	mg l ⁻¹	9,10	8,81
Mn _{celk.}	mg l ⁻¹	1,78	1,92

Obr. 2. Kinetika nitrifikace s nosičem biomasy; ● N_{amon}, ○ N-NO₂⁻, ■ N-NO₃⁻

trance dusitanů stoupala pomaleji než v testu 1, což lze vysvětlit přítomností vyššího počtu bakterií zachycených na nosiči, které jsou zodpovědné za 2. stupeň nitrifikace. Průběh koncentrace N-NO₃⁻ a N_{amon} byl podobný jako v prvním testu. V druhém kinetickém testu (s nosičem biomasy) bylo dosaženo účinnosti odstranění N_{amon} 84 % při 11hodinové době zdržení reálné důlní vody v reaktoru. Pokračování testu další 4 hodiny nevedlo již k výraznému úbytku N_{amon}. Sušina kalu před aplikací molitanu byla 1015 mg l⁻¹ (79 % organický a 21 % anorganický podíl) a

po ukončení testu byla 220 mg l⁻¹ (75 % organický a 25 % anorganický podíl). Zbylý kal (sušina cca 700 mg l⁻¹) ulpíval na povrchu a uvnitř nosiče, což byl požadavek pro uvedený test.

Identifikace nitrifikačních bakterií

Analyzována byla směs volně plovoucí biomasy a biomasy mechanicky uvolněné z polymerního nosiče. Ve vzorku byly prokázány bakterie *Betaproteobacteria* oxidující amoniak. Jednalo se o jednotlivé buňky ve vložkách kalu, klastry byly přítomny velmi výjimečně a byly pouze malé. Mezi zástupce této skupiny patří zejména rod *Nitrosomonas*. Halofilní a halotolerantní *Nitrosomonas* nebyly v reaktoru významněji zastoupeny. Z bakterií zodpovědných za druhý stupeň nitrifikace (nitrataci) byli prokázáni zástupci kmene *Nitrospirae*. Bakterie se vyskytovaly jako volné buňky, tvořily také menší a střední klastry. V některých vložkách bylo přítomno velké množství klastrů, v jiných se takřka nevyskytovaly.

Závěr

Na základě provedených testů zaměřených na odstranění amoniakálního dusíku z důlní vody biologickou nitrifikací bylo zjištěno, že v případě počátečních koncentrací N_{amon} cca 10 mg l⁻¹ byla dosahována účinnost cca 86 %. Zbytkové koncentrace N_{amon} byly 1,3–1,6 mg l⁻¹. Přítomnost nosiče biomasy nebyla podmínkou dosažení této účinnosti. Nulové koncentrace dusitanů (úplné nitrifikace) bylo dosaženo po 15hodinové době zdržení vody v reaktoru.

V experimentálním vsádkovém reaktoru byla prokázána přítomnost bakterií třídy *Betaproteobacteria*, které se vyskytovaly převážně jako volné buňky, klastry byly velmi malé s minimální četností. Ze známých bakterií oxidujících dusitany na dusičnany byl nejvíce zastoupen kmen *Nitrospirae*. Rod *Nitrobacter* detegován nebyl. Identifikace nitrifikačních bakterií byla provedena metodou FISH.

Vypracováno v rámci řešení výzkumného záměru MSM 6046137308 financovaného MŠMT ČR.

LITERATURA

1. Nařízení vlády č. 61/2003 Sb. ve znění pozdějších předpisů o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostí povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech.
2. Chvátalová M.: *Diplomová práce*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 2009.
3. Fang H. Y., Chou M. S., Huang C. H. W.: *Water Res.* 27, 1761 (1993).
4. Pitter P.: *Hydrochemie*. VŠCHT Praha, Praha 2009.
5. Ruiz G., Jeison D., Chamy R.: *Water Res.* 37, 1371 (2003).

6. Rostron W. M., Stuckey D. C., Young A. A.: *Water Res.* 35, 1169 (2001).
7. Daims H., Maixner F., Schmid M. C., v knize: *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH* (Nielsen P. H., Daims H., Lemmer H., ed.), kap. 2. IWA Publishing, London 2009.
8. Horáková M., Lischke P., Grünwald A.: *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. SNTL, Praha 1989.

E. Poláková, N. Strnadová, H. Stryjová, and M. Pečenka (*Department of Water Technology and Environmental Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Use of Biological Nitrification to Remove Ammonia Nitrogen from Mine Waters**

Mine waters contains high concentrations of ammonia nitrogen (N_{am}), sulfates, Fe and Mn. Their concentrations must be decreased before release to surface waters. This work is aimed at removing N_{am} by biological oxidation (nitrification). The total efficiency of the removal for the initial concentrations 10–11 mg L⁻¹ N_{am} was ca. 86 %, both with and without using biomass carrier. The reaction time was 15 h. The nitrification bacteria in mine waters were monitored by the FISH (fluorescence *in situ* hybridization) method. Of ammonia oxidation bacteria, *Betaproteobacteria* were detected. The *Nitrospira* bacteria predominated in nitrite oxidation. Genus *Nitrobacter* was not detected in this process.