

C.11. BIODEGRADACJA. BADANIA STOPNIA HAMOWANIA ODDYCHANIA OSADU CZYNNEGO

1. METODA

1.1. Wstęp

Metoda służy do oceny wpływu badanej substancji na mikroorganizmy poprzez pomiar szybkości oddychania w określonych warunkach w obecności badanej substancji w różnych stężeniach.

Celem tej metody jest opracowanie szybkiej wstępnej metody dla identyfikacji substancji, które mogą niekorzystnie zmieniać aerobowe warunki mikrobiologiczne oczyszczalni ścieków, oraz określenie stężeń badanej substancji, które nie działają hamująco i które mogą być użyte w badaniach podatności na biodegradację.

Badanie wstępne zakresu stężeń może poprzedzać badanie właściwe. Pozwala ono na uzyskanie informacji o zakresie stężeń użytych w badaniu właściwym.

Stosuje się dwie próbki kontrolne bez badanej substancji, jedną na początku, drugą na końcu każdej serii badań. Każda porcja osadu czynnego powinna być sprawdzona przy użyciu substancji kontrolnej.

Metoda znajduje najlepsze zastosowanie w przypadku substancji, które ze względu na ich rozpuszczalność w wodzie i niską lotność mogą pozostawać w wodzie.

Dla substancji o ograniczonej rozpuszczalności w badanym podłożu może nie być możliwe określenie wartości EC_{50} .

Jeśli badana substancja wykazuje skłonność do rozprzęgania oksydatywnej fosforylacji, wyniki oparte na poborze tlenu mogą prowadzić do błędnych wniosków.

Przy prowadzeniu badania warto dysponować następującymi informacjami:

- rozpuszczalność w wodzie,
- prężność par,
- budowa cząsteczkowa,
- czystość badanej substancji.

Ponieważ osad aktywny może zawierać potencjalnie patogenne organizmy, należy przy pracy z nim zachować ostrożność.

1.2. Definicje i jednostki

1. Szybkość oddychania: zużycie tlenu przez mikroorganizmy w napowietrzonym ścieku, wyrażone w mg O_2 na mg ścieku na godzinę.

W celu obliczenia hamującego efektu badanej substancji w określonym stężeniu, szybkość oddychania wyraża się jako średni procent szybkości oddychania z dwóch kontrolnych próbek:

$$\left(1 - \frac{2S_s}{S_{e1} + S_{e2}}\right) \times 100 = \text{procent zahamowania}$$

gdzie:

S_s – szybkość zużycia tlenu w badanym stężeniu badanej substancji/preparatu,

S_{e1} – szybkość zużycia tlenu w badaniach kontrolnych 1,

S_{e2} – szybkość zużycia tlenu w badaniach kontrolnych 2.

EC_{50} wyznaczone w tej metodzie jest to stężenie substancji badanej, przy którym szybkość oddychania wynosi 50% wartości kontrolnej w warunkach opisanych wyżej.

1.3. Substancje kontrolne

Jako substancji kontrolnej do wyznaczenia EC_{50} w każdej partii osadu aktywnego zaleca się, w celu sprawdzenia wrażliwości tego osadu, stosowanie 3,5-dichlorofenolu, który jest znanym inaktywatorem oddychania.

1.4. Zasady i metody badania

Szybkość oddychania osadu aktywnego zasilonego standardową ilością sztucznego ścieku mierzy się po czasie kontaktu wynoszącym 30 minut lub 3 godziny. Szybkość oddychania takiego samego osadu aktywnego w obecności różnych stężeń badanej substancji również mierzy się w identycznych warunkach. Hamujący efekt badanej substancji lub preparatu w określonym stężeniu jest wyrażony jako wartość procentowa średniej szybkości oddychania z dwóch badań kontrolnych kontroli. Wartość EC_{50} jest wyznaczana z oznaczeń przy różnych stężeniach.

1.5. Kryteria wiarygodności badań

Wyniki badania są wiarygodne, jeżeli:

- szybkość oddychania w obu badaniach kontrolnych nie różni się o więcej niż 15%,
- wartość EC_{50} (30 min i/lub 3 godziny) dla 3,5-dichlorofenolu osiąga wartość z akceptowanego zakresu: 5-30 mg/dm³.

1.6. Opis metody badania

1.6.1. Odczynniki

1.6.1.1. Roztwory badanych substancji

Świeże roztwory badanych substancji przygotowywane są na początku badań przy użyciu roztworu podstawowego. Jeżeli stosowana jest metoda opisana poniżej, odpowiednie jest stężenie roztworu podstawowego równe 0,5 g/dm³.

1.6.1.2. Roztwór substancji kontrolnej

Roztwór 3,5-dichlorofenolu przygotowuje się np. przez rozpuszczenie 0,5 g 3,5-dichlorofenolu w 10 cm³ 1M roztworu NaOH, dodanie ok. 30 cm³ wody destylowanej oraz dodanie przy ciągłym mieszaniu 0,5M roztworu H₂SO₄ do momentu zaczynającej się precypitacji (wystarczy około 8 cm³ 0,5M H₂SO₄). Ostatecznie uzupełnia się uzyskaną mieszaninę wodą destylowaną do 1 dm³. Wartość pH powinna mieścić się w zakresie od 7,0 do 8,0.

1.6.1.3. Sztuczny ściek

Sztuczny ściek przygotowuje się przez rozpuszczenie następujących ilości substancji w 1 dm³ wody:

Pepton	16 g,
Wyciąg mięśny	11 g,
Mocznik	3 g,
NaCl	0,7 g,
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,4 g,
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g,
K ₂ HPO ₄	2,8 g.

Jeśli przygotowane podłoże nie jest użyte natychmiast po przygotowaniu, powinno być przechowywane w ciemności w temp. 0°C do 4°C, nie dłużej niż tydzień, w warunkach, które nie spowodują zmiany jego składu. Podłoże powinno być wyjałowione przed przechowywaniem, ewentualnie pepton i wyciąg mięśny można dodać tuż przed przeprowadzeniem badania. Przed użyciem należy je dobrze wymieszać i doprowadzić pH do odpowiedniej wartości.

1.6.2. Aparatura

Aparatura do pomiaru: precyzyjne ustawienie aparatury nie jest warunkiem decydującym o jakości przeprowadzonego badania. Jednakże, należy zachować odpowiednią przestrzeń wolną, a próbnik powinien być dobrze dopasowany do szyjki naczynia pomiarowego.

Niezbędne jest podstawowe wyposażenie laboratorium, w szczególności:

- aparatura pomiarowa,
- urządzenie do napowietrzania,
- sprzęt i elektrody do pomiaru pH,
- elektroda tlenowa.

1.6.3. Przygotowanie inokulum

Zaleca się użycie osadu aktywnego z oczyszczalni ścieków przetwarzającej przede wszystkim ścieki komunalne jako inokulum mikrobiologicznego.

Jeśli to konieczne, po powrocie do laboratorium, grubsze cząstki należy usunąć poprzez sedymentację w krótkim czasie, np. 15 min, i zlanie górnej warstwy drobniejszych cząstek do użytku. Osad może być także mieszany przez kilka sekund.

Jeśli podejrzewa się obecność substancji hamujących, osad powinien być przepłukany wodą wodociagową lub roztworem izotonicznym. Po odwirowaniu, supernatant jest zlewany (procedura ta jest powtarzana trzykrotnie).

Niewielkie ilości osadu są ważone i suszone. Z uzyskanych pomiarów można obliczyć masę wilgotnego osadu, którą należy zawiesić w wodzie, by otrzymać czynny osad w stężeniu 2-4 g zawieszonych cząstek/dm³. Takie stężenie pozwala na uzyskanie w badanym podłożu stężenia z zakresu 0,8-1,6 g/dm³, pod warunkiem przestrzegania sposobu postępowania opisanego poniżej.

Jeśli osad nie może być użyty w dniu zebrania, do każdego dm³ osadu aktywnego przygotowanego jak wyżej dodaje się 50 cm³ sztucznego ścieku; osad ten jest napowietrzany przez noc w temperaturze 20±2°C. Napowietrzenie utrzymuje się do momentu użycia w ciągu dnia. Przed użyciem sprawdza się pH, które w razie konieczności doprowadza się do wartości zawartej w granicach 6,0-8,0. Cząstki zawieszone w mieszanym płynie powinny być oznaczane według opisu umieszczonego w metodzie „Biodegradacja. Badania symulacyjne osadu czynnego”.

Jeśli ta sama partia osadu musi być użyta w następnych dniach (najpóźniej w ciągu 4 dni), przy końcu każdego dnia roboczego dodaje się dalsze 50 cm³ sztucznego ścieku na każdy dm³ osadu.

1.6.4. Wykonanie badania

Czas trwania/czas kontaktu:	30 min i/lub 3 godziny, podczas których zachodzi proces napowietrzania
Woda:	woda pitna (koniecznie odchlorowana)
Powietrze:	czyste, bez oleju, przepływ powietrza 0,5-1 dm ³ /min
Aparatura do pomiaru:	płaskodenna kolba, taka jak do pomiaru BZT
Miernik tlenu:	stosowna elektroda tlenowa z zapisem
Roztwór odżywczy:	sztuczny ściek
Badana substancja:	roztwór badanej substancji świeżo przygotowywany na początku badania
Substancja kontrolna:	np. 3,5-dichlorofenol (przynajmniej trzy stężenia)
Kontrole:	inokulowane próbki bez badanej substancji
Temperatura:	20±2°C

Sugerowaną procedurę doświadczalną, którą można zastosować dla substancji badanej i kontrolnej, podano poniżej: Używa się kilku naczyń (np. zlewek o pojemności 1 dm³).

Przygotować co najmniej 5 roztworów o stężeniach różniących się między sobą o stały współczynnik nieprzekraczający wartości 3,2.

W czasie „0” 16 cm³ sztucznego ścieku uzupełnić wodą do 300 cm³. Dodać 200 cm³ inokulum mikrobiologicznego i całość (500 cm³) przełać do pierwszego naczynia (kontrola pierwsza C₁).

Badane naczynie powinno być ciągle napowietrzane, co powoduje, że ilość rozpuszczonego tlenu nie spada poniżej 2,5 mg/dm³, oraz że bezpośrednio przed pomiarem szybkości oddychania, stężenie tlenu będzie wynosić ok. 6,5 mg/dm³.

W czasie „15 minut” (15 minut jest arbitralnie ustalonym, lecz wygodnym przedziałem czasowym) powyższa procedura powinna być powtarzana, z wyjątkiem tego, że dodaje się 100 cm³ roztworu podstawowego badanej substancji do 16 cm³ sztucznego ścieku przed uzupełnieniem wodą do 300 cm³ i inokulum mikrobiologicznego do objętości 500 cm³. Mieszaninę przelewa się następnie do drugiego naczynia i napowietrza w sposób opisany powyżej. Proces powinien być powtarzany w 15 minutowych odstępach, z zastosowaniem różnych objętości

roztworu podstawowego badanej substancji, w celu otrzymania serii naczyń zawierających różne stężenia badanej substancji. Ostatecznie, przygotowuje się drugą kontrolę (C_2).

Po upływie trzech godzin mierzy się pH i dokładnie wymieszaną próbkę z naczynia pierwszego przelewa się do aparatu pomiarowego w celu pomiaru szybkości oddychania w czasie do 10 minut.

Oznaczenie to jest przeprowadzane dla zawartości każdego naczynia w 15-minutowych odstępach w taki sposób, że czas kontaktu w każdym naczyniu wynosi 3 godziny.

Substancja kontrolna jest badana na każdej partii inokulum mikrobiologicznego w ten sam sposób.

Postępowanie według innego schematu (np. konieczność liczby aparatów większej niż 1 do pomiaru ilości tlenu) będzie konieczne, gdy pomiary będą przeprowadzane po 30 min kontaktu.

Jeśli wymagany jest pomiar zużycia tlenu, w następnych naczyniach przygotowuje się badaną substancję, sztuczny ściek i wodę, lecz bez osadu czynnego. Zużycie tlenu jest oznaczane i odnotowywane po czasie napowietrzania 30 minut i/lub 3 godziny (czas kontaktu).

2. WYNIKI ICH I OCENA

Szybkość oddychania wyliczana jest z zapisu aparatu do pomiaru zawartości tlenu pomiędzy ok. $6,5 \text{ mg tlenu/dm}^3$ i $2,5 \text{ mg tlenu/dm}^3$, lub w 10 min okresie, kiedy szybkość oddychania jest niska. Część krzywej oddychania, podczas której oznacza się szybkość oddychania, powinna być linią prostą.

Jeśli szybkość oddychania w dwóch grupach kontrolnych różni się więcej niż 15% lub EC_{50} dla substancji kontrolnej (30 min i/lub 3 godzinne) nie mieści się w akceptowanym przedziale ($5\text{-}30 \text{ mg/dm}^3$ dla 3,5-dichlorofenolu), badanie musi być powtórzone.

Stopień hamowania wyrażony w procentach jest obliczany dla każdego badanego stężenia. Powinien on być wykreślony w funkcji stężenia na wykresie logarytmiczno-normalnym (lub logarytmiczno-probitowym). Należy wyliczyć wartość EC_{50} .

95% przedział ufności dla wartości EC_{50} może być oznaczony przy pomocy standardowych procedur.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badania

W sprawozdaniu zamieszcza się, z uwzględnieniem zakresu badań, następujące informacje:

- a) badana substancja: dane chemiczne,
- b) badany układ: źródło, stężenie, i jakakolwiek obróbka wstępna osadu aktywnego,
- c) warunki badania:
 - pH mieszaniny reakcyjnej przed pomiarem oddychania,
 - temperatura,
 - czas trwania badania,
 - substancja kontrolna i jej EC_{50} ,
 - abiotyczny pobór tlenu (jeśli zachodzi),
- d) wyniki:
 - wszystkie dane z pomiarów,
 - krzywa zahamowania i metoda wyliczania EC_{50} ,
 - EC_{50} i, jeśli to możliwe, 95% przedział ufności EC_{20} i EC_{80} ,
 - wszystkie obserwacje i odchylenia dotyczące metody mogące wpływać na uzyskiwane wyniki.

3.2. Interpretacja wyników

Wartość EC_{50} powinna być traktowana jako wskazówka toksyczności badanej substancji względem osadu aktywnego lub mikroorganizmów ścieków. Złożone interakcje zachodzące w środowisku nie mogą być dokładnie oddane podczas badania laboratoryjnego. Dodatkowo, badana substancja, która może wywierać efekt hamujący na utlenianie amoniaku, może także być przyczyną nietypowej krzywej zahamowania. Krzywe takie powinny być interpretowane z ostrożnością.