

MEASUREMENT OF DEHYDROGENASE ACTIVITY AND TRADITIONAL METHOD OF MICROORGANISMS COUNT ESTIMATION AS INDICATORS OF MICROORGANISMS ACTIVITY IN COMPOST FROM MUNICIPAL SEWAGE SLUDGE

Summary

The study presents a measurement method of dehydrogenase activity in composts. The results of measurements were later compared with the data obtained from assays of the total numbers of microorganisms (mesophilic and thermophilic bacteria, moulds and yeasts) using the method of flood culture. The authors examined the correlation between the two methods employed to assess the activity and the physiological status of compost settling microorganisms. The performed statistical analysis failed to show any correlations between the total number of microorganisms determined by the traditional and plate methods and the measurement of dehydrogenase activity. The determination of the total number of microorganisms does not provide a full answer to the question of the physiological status of microorganisms carrying out the composting process.

POMIAR AKTYWNOŚCI DEHYDROGENAZ A TRADYCYJNA METODA OZNACZANIA LICZBY MIKROORGANIZMÓW JAKO WSKAŹNIKI AKTYWNOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ KOMPOSTU Z KOMUNALNEGO OSADU ŚCIEKOWEGO

Streszczenie

W pracy przedstawiono metodę pomiaru aktywności dehydrogenaz w kompostach i porównano otrzymane wartości z danymi uzyskanymi z oznaczenia ogólnej liczby mikroorganizmów (bakterii mezofilnych i termofilnych, pleśni i drożdży) metodą posiewu zalewowego. Zbadano korelację pomiędzy dwiema metodami zastosowanymi w celu sprawdzenia aktywności i stanu fizjologicznego mikroorganizmów zasiedlających kompost. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej wykazano brak jakiegokolwiek zależności pomiędzy oznaczeniem ogólnej liczby mikroorganizmów metodą tradycyjną – płytkową a pomiarem aktywności dehydrogenaz. Oznaczenie ogólnej liczby mikroorganizmów nie daje pełnej odpowiedzi na temat stanu fizjologicznego mikroorganizmów prowadzących proces kompostowania.

1. Wstęp

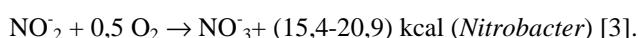
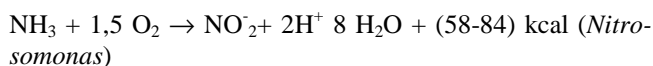
Klasyczne metody pomiaru aktywności mikrobiologicznej w kompostach polegają na oznaczeniu liczby bakterii mezofilnych i termofilnych oraz na oznaczeniu liczby pleśni i drożdży. Metody te jednak nic nie mówią o aktywności fizjologicznej mikroorganizmów w kompostach, a jedynie o ich liczbie. Ponadto, w niektórych przypadkach mikroorganizmy oznaczane jako mezofilne, wykazują właściwości termotolerancyjne i zawyżają wyniki liczby bakterii termofilnych. Często dzieje się tak, że zsumowanie liczby bakterii mezo- i termofilnych znacznie przewyższa maksymalną teoretyczną liczbę bakterii w danej jednostce objętości. Inny problem dotyczy oznaczania pleśni, które rosną w formie grzybni, zatem trudno tu mówić o ich liczbie. Istotnym zagadnieniem jest zaś wytwarzanie form przetrwalnych przez mikroorganizmy zasiedlające kompost [1]. Ponieważ przeważająca liczba bakterii w kompostach to laseczki, które mają zdolność w niesprzyjających warunkach do wytwarzania przetrwalników. Z kolei grzyby wytwarzają olbrzymie ilości zarodników. Zatem występujące w kompoście wszystkie formy przetrwalne na pożywkach hodowlanych rozwiną się w formy wegetatywne, zawyżając znacznie wynik oznaczeń [2].

2. Przemiany biochemiczne w procesie kompostowania

Najistotniejszymi przemianami zachodzącymi w kompostach są przemiany związków węgla i azotu. Są to złożone procesy enzymatyczne.

W wyniku rozkładu azotu organicznego (amoniakacja) powstaje azot amonowy, który jest wykorzystywany przez mikroorganizmy do syntezy biomasy lub może być utleniany w procesie nitrifikacji. Nitrifikacja polega na utlenieniu przez bakterie autotroficzne *Nitrosomonas sp.* i *Nitrobacter sp.* azotu amonowego do azotanów.

Proces przebiega dwustopniowo. Zachodzące reakcje ilustrują równania:



Szybkość drugiej reakcji jest znacznie większa niż pierwszej, więc w normalnych warunkach stężenie azotanów w pryzmie jest niewielkie.

Powstający w tym procesie amoniak jest główną przyczyną strat azotu podczas kompostowania. Straty azotu

mogą być również spowodowane istnieniem ognisk beztlenowych w przyzbie kompostowej, w których zachodzi mikrobiologiczna redukcja azotanów (denitryfikacja) [4, 5].

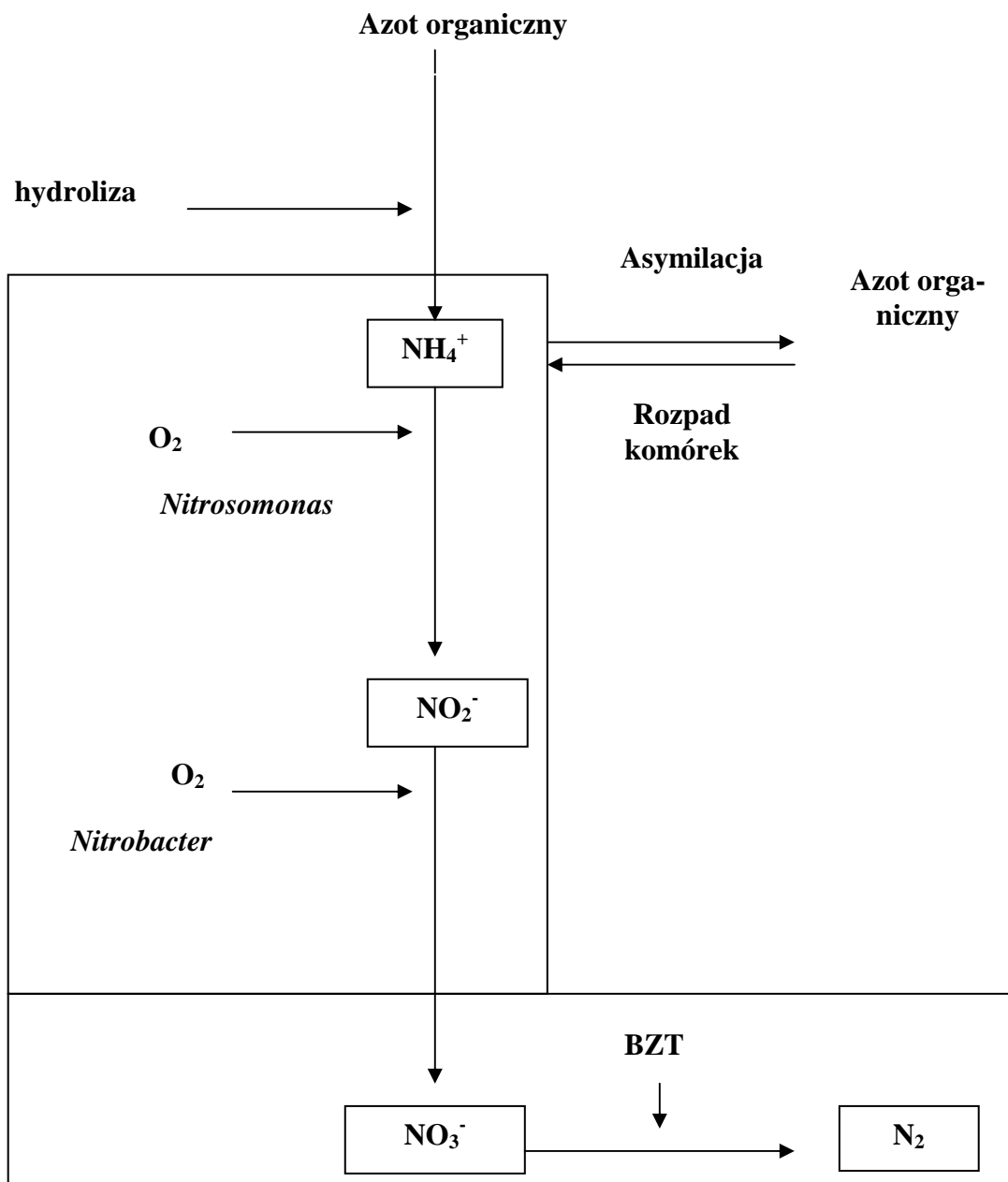
Denitryfikacja polega na biochemicznej redukcji azotanów do gazowych form azotu. Dominującymi procesami podczas przebiegu procesu kompostowania są: mineralizacja, humifikacja oraz butwienie, murszenie i zwęglanie [6].

Mineralizacja substancji organicznych zawartych w poddawanej kompostowaniu biomasy przebiega stopniowo. W pierwszym etapie procesu następuje hydroliza złożonych substancji pochodzenia naturalnego do związków prostych. Związki organiczne zawarte w przyzmach kompostowych podlegają utlenieniu przez organizmy heterotroficzne z wykorzystaniem tlenu jako ostatecznego akceptora elektronów, a końcowymi produktami biodegradacji są woda i dwutlenek węgla, którego emisja do atmosfery powoduje znaczne straty węgla ogólnego.

Straty węgla mogą być również powodowane emisją metanu i lotnych związków organicznych [7, 8].

Mineralizacja jest procesem egzotermicznym, w wyniku którego uzyskuje się energię cieplną, która podnosi temperaturę masy unieszkodliwianych odpadów. Niekorzystnym zjawiskiem jest fakt, iż mineralizacja prowadzi jednak w konsekwencji do zmniejszenia ilości substancji organicznej w finalnym produkcie, czyli kompoście. Ważne jest zatem odpowiednie sterowanie procesami tak, aby utrzymać proces mineralizacji na poziomie niezbędnym do zapewnienia odpowiedniej temperatury potrzebnej do unieszkodliwiania odpadów, a równocześnie nie dopuszczać do nadmiernego rozkładu substancji organicznej.

Z punktu widzenia jakości produktu finalnego proces humifikacji jest drugim po mineralizacji bardzo ważnym procesem zachodzącym w trakcie kompostowania. Jest to proces biochemiczny, podczas którego składniki organiczne biomasy ulegają syntezie do związków humusowych. Związki te z uwagi na swe właściwości sorpcyjne jonowymienne przyczyniają się do poprawy właściwości gleb [9]. Zatem, aby ocenić stan fizjologiczny mikroorganizmów należy oznaczyć aktywność enzymów oksydo-redukcyjnych.



Rys. 1. Przemiany związków azotu

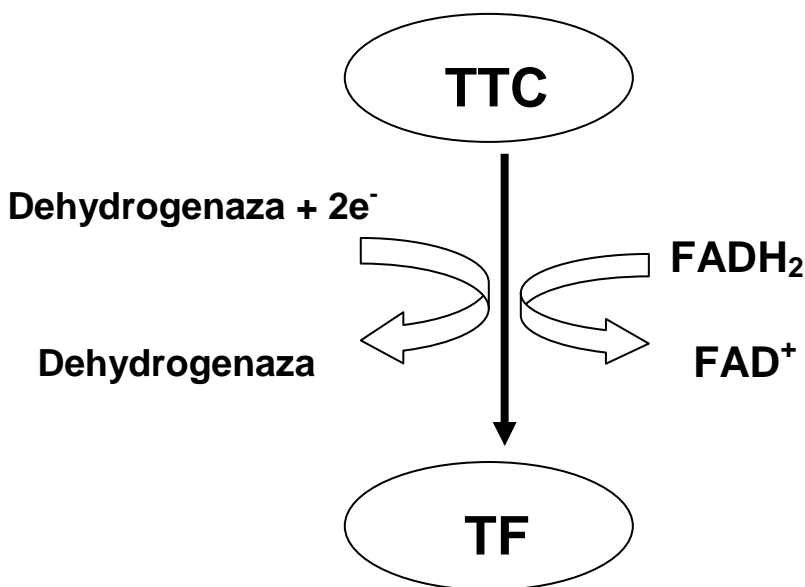
Fig. 1. Forms of nitrogen changes

3. Enzymy z grupy oksydoreduktaz

Dehydrogenazy to enzymy z grupy oksydoreduktaz, które katalizują utlenianie substancji organicznych. Enzymy te odłączają elektrony od substratu i łączą je z protonami. Oddawanie elektronów na tlen następuje poprzez przenośniki elektronów np.: NAD, NADP, flawoproteiny, ubichinon, cytochromy. Sumę wymienionych reakcji można przedstawić za pomocą reakcji TTC [10]. Aktywność dehydrogenaz może być wskaźnikiem aktywności biochemicznej kompostu, czyli jego zdolności do rozkładu związków organicznych zawartych w kompoście [11].

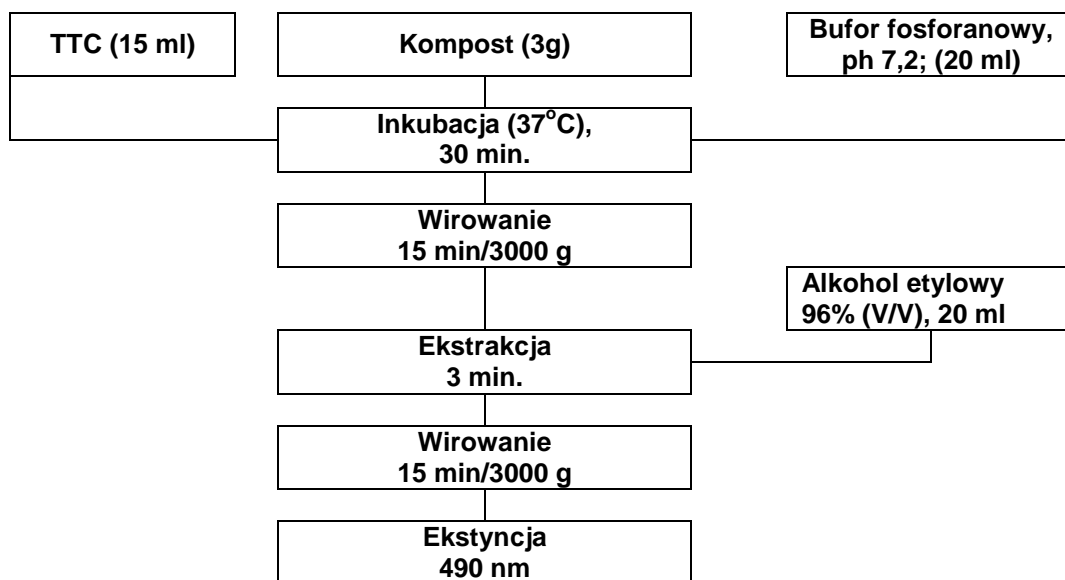
4. Zasada metody oznaczania aktywności dehydrogenaz (test TTC)

Chlorek trifenylotetrazoliowy (TTC) jest związkiem bezbarwnym. Jako akceptor wodoru redukuje się pod wpływem wodoru do zabarwionego na czerwono trifenyloformazanu (TF). Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości dehydrogenaz w kompoście, a ściślej mówiąc, w wewnętrznej masie komórkowej mikroorganizmów wchodzących w skład kompostu. Innymi słowy wynik tego oznaczenia pozostaje w ściślejszej zależności do liczebności i aktywności bakterii zawartych w kompoście [10].



Rys. 2. Schemat przebiegu reakcji enzymu dehydrogenazy z chlorkiem trifenylotetrazoliowym
 Fig. 2. Scheme of dehydrogenase enzyme and triphenyltetrazolium chloride reaction

5. Metoda oznaczania aktywności dehydrogenaz (test TTC)



Rys. 3. Metoda oznaczania aktywności dehydrogenaz w kompoście
 Fig. 3. Method of dehydrogenase activity estimation in compost

6. Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły dwa warianty kompostu z komunalnego osadu ściekowego: I - z dodatkiem słomy pszennej, II - z dodatkiem obornika. Osad ściekowy pochodził z Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach.

6.1. Założenia metodyczne doświadczenia kompostowego

Do realizacji doświadczenia kompostowego przyjęto metodę tlenową z dodatkiem strukturotwórczych materiałów organicznych (słoma pszenna i obornik bydlęcy). Badania nad procesem kompostowania tlenowego komunalnego osadu ściekowego prowadzono w pojemnikach kompostowych o pojemności 25 litrów przez 3 miesiące w klimatyzowanym pomieszczeniu w temperaturze 30°C.

7. Wyniki i dyskusja

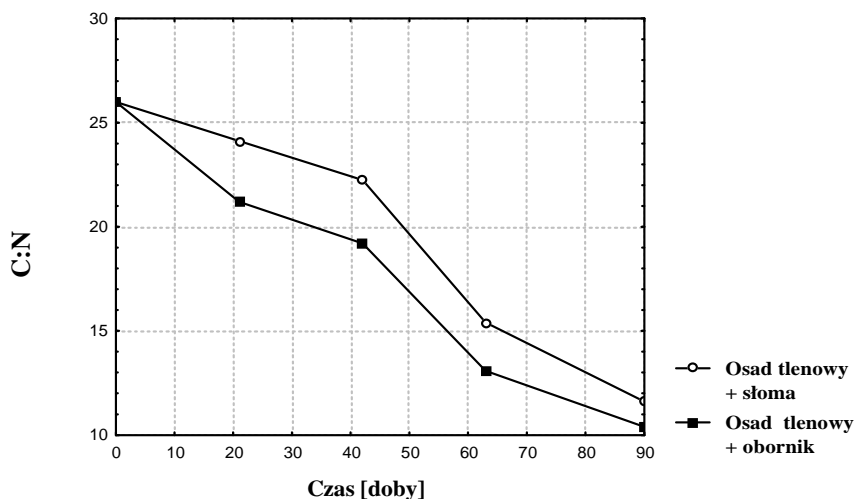
Wartość stosunku C:N około 15 wyraża stabilizację kompostowanej masy, a wartość poniżej 12 świadczy o wysokim stopniu dojrzałości kompostu [9, 10].

Konsekwencją przemian związków węgla i azotu było systematyczne zawężanie się stosunków C:N. Szczególnie istotne zmiany zaobserwowano ($p < 0,034$) w kompoście osad tlenowy + obornik gdzie stosunek C:N zawężał się z

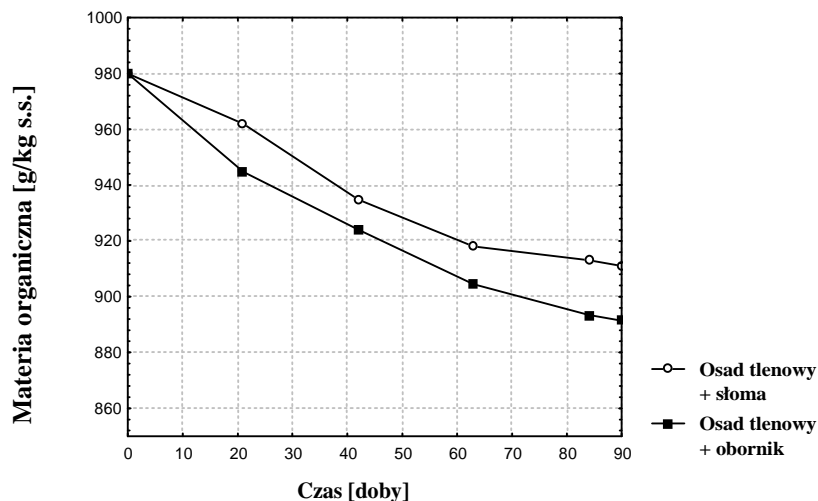
26:1 do 10,4:1. Natomiast w przypadku kompostu z dodatkiem słomy C:N zawężał się z 26:1 do 11,6:1 (rys. 4).

Analiza zawartości materii organicznej wykazała istotną statystycznie różnicę przemian pomiędzy próbą kontrolną a właściwą ($p < 0,018$). W przypadku kompostu osad tlenowy + obornik proces ten przebiegał intensywniej. Największą różnicę zanotowano od 28 doby kompostowania i stan taki utrzymywał się do końca trwania procesu. Zawartość materii organicznej w w/w kompoście zmalała o 11%, a w kompoście z dodatkiem słomy o 7% (rys. 5).

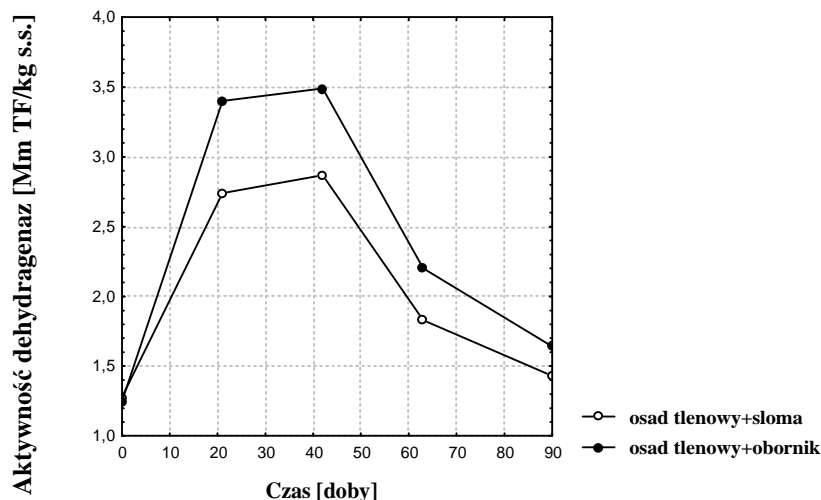
Według Tiquia [12] aktywność dehydrogenaz umożliwia prześledzenie stanu fizjologicznego mikroorganizmów w kompoście. Już na początku doświadczenia notowano aktywność w kompoście + obornik i kompoście osad tlenowy + słoma na poziomie 1,3 mM TF/kg s.s.. W miarę postępowania biodegradacji materiału kompostowego obserwowano wyraźny wzrost aktywności dehydrogenaz. W 42 doby w kompoście z obornikiem do 3,4 mM TF/kg s.s. kompostu, a w wariantcie ze słomą do 2,7 mM TF/kg s.s. kompostu. Następnie notowano stopniowy spadek aktywności dehydrogenaz w kompostach [rys.6]. Stwierdzono wyższą aktywność dehydrogenaz w kompoście z dodatkiem obornika, niż w kompoście z dodatkiem słomy ($p < 0,05$).



Rys. 4. Zmiany stosunku C:N w kompostach podczas przebiegu procesu biodegradacji
Fig. 4. Changes of C:N in composts during biodegradation process

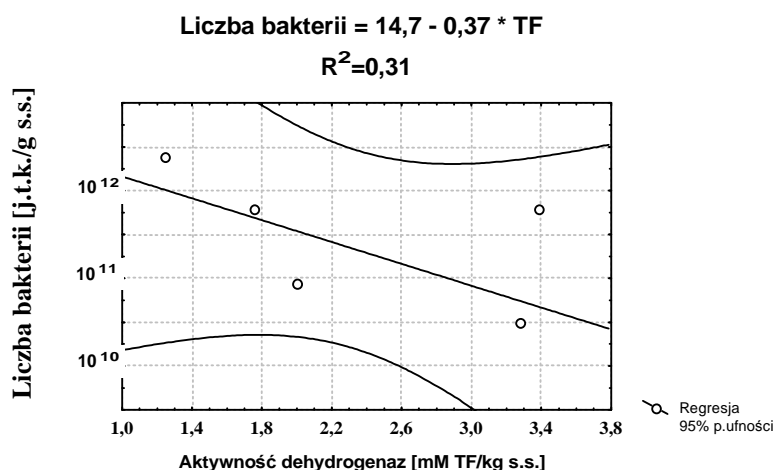


Rys. 5. Zmiany zawartości materii organicznej w kompostach podczas przebiegu procesu biodegradacji
Fig. 5. Changes of organic matter content in composts during biodegradation process



Rys. 6. Zmiany aktywności dehydrogenaz w kompostach z komunalnego osadu ściekowego w zależności od czasu kompostowania
 Fig. 6. Influence of composting duration over the changes of dehydrogenase activity from municipal sewage sludge composts

8. Zależność pomiędzy ogólną liczbą komórek bakterii mezo- i termofilnych a aktywnością dehydrogenaz



Rys. 7. Zależność pomiędzy ogólną liczbą komórek bakterii a aktywnością dehydrogenaz
 Fig. 7. Correlation of total amount of microorganisms and dehydrogenase activity

9. Podsumowanie

Podsumowując można skonstatować, że nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności pomiędzy ogólną liczbą komórek bakterii mezo- i termofilnych a aktywnością dehydrogenaz ($p > 0,23$).

10. Literatura

- [1] Jeris L., Regan E.: Controlling environmental parameters for optimum composting. J. Compost Sci., 1973, 14; 10-15
- [2] W. Kunicki-Goldfinger: Życie bakterii. Warszawa, wyd. PWN, 2000, 45-68
- [3] Kowal A.: Odnowa wody. Podstawy biologiczne procesów. Wyd. Politechniki Wrocławskiej 1997, 60-69
- [4] Jeter R. M., Ingraham J.L.: The denitrifying Procaroyotes in: The Procaroyotes. Springer-Verlag Berlin, Heilderberg; 1981, 913-925
- [5] Krzywy E., Wołoszczyk C., Izewska A.: Przemiany zawartości azotu amonowego i azotanowego zachodzące w kompostach z komunalnych osadów ściekowych podczas procesu ich rozkładu. Zesz. Nauk. AR w Szczecinie 2000, (84), 211-216
- [6] Kalembasa S., Makowiecki K., Kalembasa D.: Skład chemiczny oraz frakcje azotu i węgla w biohumusach uzyskanych z osadów ściekowych. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 1993, 409; 159-166
- [7] Krzymien M., Day M., Shaw K., Zaremba L.: An investigation of odors and volatile organic compounds released during composting. J. of the Air & Waste Manag. Associ., 1999, 49; 804-813
- [8] Keeling A.A., Griffiths B.S., Ritz K., Myers M.: Effects of compost stability on plant growth, microbiological parameters and nitrogen availability in media containing mixed garden-waste compost. Biores. Techn., 1995, 54; 279-284
- [9] Drozd J., Linczar M.: Zmiany w składzie chemicznym kompostów z odpadków miejskich w czasie ich kompostowania. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. AR Wrocław; 1996, 45-57
- [10] Eiland F., Klame M., Lind A.M., Baath E.: Influence of initial C/N ratio and microbial composition during long term composting of straw. Microb. Ecol., 2001, 41; 272-280
- [11] Hermanowicz W.: Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków. Wyd. Arkady, Warszawa; 1999
- [12] Tiquia S., Judy Wan H.C., Nora Tam F.Y.: Dynamics of yard trimmings composting as determined by dehydrogenase activity, ATP content, arginine ammonification, and nitrification potential. Process Biochemistry. 2002 (37) 1057-1065.