

Małgorzata ZŁOTUCHA¹, Agnieszka ROŻEJ¹ i Grzegorz ŁAGÓD¹

WPŁYW BIOSURFAKTANTA RECO 10 NA MORFOLOGIĘ KŁACZKÓW OSADU CZYNNEGO

EFFECT OF BIOSURFACTANT RECO 10 ON THE MORPHOLOGY OF ACTIVATED SLUDGE

Abstrakt: Końcowy efekt oczyszczania biologicznego ścieków w znacznej mierze zależy od skuteczności oddzielania osadu czynnego od oczyszczonych ścieków. Właściwości sedymentacyjne osadu czynnego związane z wielkością, kształtem i gęstością kłaczków mogą ulec pogorszeniu w wyniku nadmiernego rozrostu bakterii nitkowatych lub kumulacji zewnątrzkomórkowych polimerów o znacznym uwodnieniu. W poszukiwaniu działającego wybiórczo i bezpiecznego dla środowiska środka redukującego liczebność organizmów nitkowatych przebadano wpływ biosurfaktanta Reco 10 na morfologię osadu czynnego. Bezpośrednio po wprowadzeniu roztworów biopreparatu do zawiesiny osadu czynnego nie wystąpiły zmiany w indeksie objętościowym osadu. Jednak po 24 godzinach inkubacji liczebność bakterii nitkowatych w kłaczkach osadu czynnego zmniejszyła się w porównaniu z kontrolą o 39 do 67% w zależności od stężenia środka powierzchniowo czynnego. Przy stężeniach 20 i 50 mg dm⁻³ biopreparatu obserwowano prawie 20% spadek aktywności oddechowej osadu mierzonej na podstawie ilości wydzielonego CO₂. Mimo tego hamującego aktywność oddechową działania, po 24 godzinach od dodania Reco 10 morfologia osadu czynnego uległa wyraźnej poprawie. Zaobserwowano poprawę spójności kłaczków, wzrost ich gęstości i regularności kształtów, mimo zmniejszenia średnich rozmiarów skupisk nawet o odpowiednio 21 i 17% nie doszło również do zaniku mikrofauny.

Słowa kluczowe: osad czynny, morfologia kłaczków, biosurfaktanty

W oczyszczaniu ścieków metodą osadu czynnego może występować szereg trudnych do usunięcia problemów, w tym pęcznienie osadu i powstawanie piany. W wyniku masowego rozwoju organizmów nitkowatych lub *Zoogloea* powstaje osad o złych właściwościach sedymentacyjnych, a w oczyszczonych ściekach mogą występować nitkowate kłaczkowate [1].

Kontrolę liczebności bakterii nitkowatych można prowadzić poprzez modyfikacje systemu oczyszczania ścieków, metody mechaniczne, chemiczne (silne utleniacze, m.in. chlor, H₂O₂ czy O₃) lub fizyczne (stosowanie koagulantów i flokulantów jako obciążników kłaczków). Większość z tych metod obniża przejściowo aktywność metaboliczną osadu czynnego. Dlatego uzasadnione jest poszukiwanie bezpiecznych dla środowiska i wybiórczo działających substancji regulujących liczebność bakterii nitkowatych. Do takich niekonwencjonalnych metod zalicza się również stosowanie substancji powierzchniowo czynnych.

Biosurfaktanty w przeciwieństwie do odpowiedników syntetycznych mają wiele zalet, wynikających między innymi z niskiej toksyczności, szybkiej biodegradacji oraz bardzo zróżnicowanych właściwości fizykochemicznych [2-6], a ich budowę chemiczną można modyfikować, dobierając skład pożywki oraz warunki hodowli drobnoustrojów [7]. Biologiczne surfaktanty działają w szerokim zakresie pH, temperatury oraz zasolenia środowiska [2, 4, 8].

¹ Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Lubelska, ul. Nadbystrzycka 40B, 20-618 Lublin, tel. 81 538 43 03, email: A.Rozej@wis.pol.lublin.pl

Niektóre surfaktanty pochodzenia mikrobiologicznego wykazują działanie lityczne w stosunku do organizmów żywych. Najwyższą aktywność lityczną w stosunku do bakterii nitkowatych przejawiały szczepy *Bacillus polymyxa*, wytwarzające substancje przypominające surfaktynę [9].

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu biopreparatu Reco 10 na morfologię osadu czynnego i liczebność bakterii nitkowatych w kłaczkach osadu.

Material i metody

Badania prowadzono w maju 2009 roku z wykorzystaniem osadu czynnego pochodzącego z mechaniczno-biologicznej oczyszczalni ścieków bytowo-gospodarczych Hajdów w Lublinie o średnim strumieniu ścieków około $60\,000\text{ m}^3 \cdot \text{d}^{-1}$. Osad czynny pracował w następujących warunkach: obciążenie $0,104\text{ kg BZT}_5\text{ kg}^{-1}\text{ s.m.d}^{-1}$, wiek 10 d, zawartość suchej masy $7,06\text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, indeks objętościowy $88,4\text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}\text{ s.m}$.

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano biosurfaktant Reco 10 (Jeneil Biosurfactant Company), złożony z pozakomórkowych ramnolipidów bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, charakteryzujący się niską toksycznością w stosunku do organizmów żywych oraz wysoką podatnością na biodegradację [10].

Opis doświadczenia. Do pięciu cylindrów miarowych o pojemności 250 cm^3 każdy wprowadzono po 250 cm^3 dobrze wymieszanej zawiesiny osadu czynnego. Jeden cylinder stanowił kontrolę bez dodatku surfaktanta, do pozostałych czterech cylindrów dodano odpowiednie ilości Reco 10, uzyskując stężenia 5, 10, 20 i $50\text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Próbkę osadu do analiz mikroskopowych pobierano po 30, 60 i 90 minutach sedimentacji oraz po 24 godzinach wytrząsania.

Pomiary średnic kłaczek osadu oraz liczebności bakterii nitkowatych wykonywano w preparatach mikroskopowych barwionych metodą Grama. Analizę obrazu mikroskopowego przeprowadzono z użyciem programu MultiScan.

Aktywność oddechową zawiesiny osadu czynnego wyznaczono na podstawie przyrostu stężenia CO_2 wydzielonego w jednostce czasu. Stężenie gazu oznaczono przy użyciu chromatografu gazowego, wyposażonego w detektor przewodnictwa cieplnego TCD.

Wyniki i ich dyskusja

Osad użyty w doświadczeniu charakteryzował się znaczną liczbą bakterii nitkowatych (15 szt./kłaczek), dużymi rozmiarami nieregularnych kłaczek (średnio $238,5\text{ }\mu\text{m}$) oraz istnieniem licznych połączeń między kłaczkami za pomocą długich nitek z delikatnym porostem (rys. 1). W osadzie licznie występowały ameby skorupkowe z rodzaju *Arcella* [11].

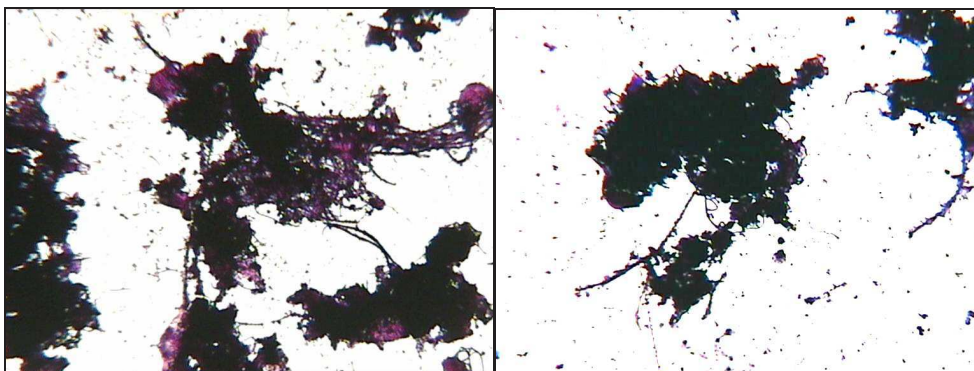
Biopreparat Reco 10 nie spowodował w czasie 30 minut po dodaniu znaczącej zmiany indeksu objętościowego osadu czynnego w porównaniu do próbki kontrolnej. W preparatach mikroskopowych nie zaobserwowano wyraźnych zmian morfologicznych podczas pierwszych dwóch godzin po dodaniu środka powierzchniowo czynnego.



Rys. 1. Osad czynny przed dodaniem biosurfaktanta Reco 10

Fig. 1. Activated sludge before biosurfactant Reco 10 amendment

Po 24 godzinach wytrząsania zaobserwowano poprawę spójności kłaczków osadu, przede wszystkim wzrost ich gęstości. W próbce kontrolnej bez dodatku biosurfaktanta w kłaczkach nadal licznie występowały bakterie nitkowate (rys. 2 - po lewej). W próbkach zawierających preparat Reco 10 zaobserwowano mniej bakterii nitkowatych, szczególnie tych wystających poza kłaczek i tworzących pomosty między sąsiednimi skupiskami bakterii zooglealnych. Najbardziej regularne kształty i największą gęstość kłaczków zaobserwowano w próbce z dodatkiem Reco 10 w stężeniu $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (rys. 2 - po prawej). Poza granicą kłaczków w tle widoczne były liczne krótkie fragmenty zdegradowanych nitek.



Rys. 2. Osad czynny po 24 godzinach wytrząsania bez dodatku biosurfaktanta (po lewej), osad czynny po 24 godzinach wytrząsania z dodatkiem Reco10 ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) (po prawej)

Fig. 2. Activated sludge after 24 h incubation without biosurfactant (at the left), activated sludge after 24 h incubation with $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ of Reco 10 (at the right side)

Wraz ze wzrostem stężenia biosurfaktanta zaobserwowano spadek liczby bakterii nitkowatych liczonych wzdłuż obrysu kłaczków osadu czynnego (tab. 1) odpowiednio o: 39% ($5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), 45% ($10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), 61% ($20 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) i 67% ($50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$).

Działanie lityczne wobec bakterii nitkowatych osadu czynnego obserwowali wcześniej Kitatsuji i in. [9], stosując związki powierzchniowo czynne produkowane przez *Bacillus polymyxa*. Natomiast destrukcyjne działanie ramnolipidu na błony plazmatyczne bruzdnic (*Dinoflagellata*) wykazali Wang i in. [5].

Tabela 1
Charakterystyka kłaczków osadu czynnego po 24 godzinach inkubacji z biosurfaktantem Reco 10

Table 1
Characteristic of activated sludge fock after 24h incubation with biosurfactant Reco 10

Stężenie Reco 10 [mg · dm ⁻³]	Średnica kłaczków [μm]		Liczba bakterii nitkowatych w kłaczku		Aktywność oddechowa osadu czynnego [mg CO ₂ · g ⁻¹ s.m. · h ⁻¹]
	Średnia	SD	Średnia	SD	Średnia
0	227,1	90,2	18	8,7	4,738
5	228,9	87,1	11	4,97	5,236
10	234,8	119,6	10	4,26	6,074
20	179,6	106,2	7	4,36	3,944
50	189,2	80,0	6	3,45	4,142

Biosurfaktant Reco 10 użyty w niniejszym doświadczeniu spowodował zmniejszenie rozmiarów kłaczków osadu czynnego po 24 godzinach od dodania (tab. 1) jedynie o 21 i 17% (przy stężeniach Reco 10 odpowiednio 20 i 50 mg · dm⁻³), podczas gdy syntetyczne surfaktanty wywoływały saponifikację kłaczków w badaniach Liwarskiej-Bizukojć i in. [12] oraz Liwarskiej-Bizukojć i Bizukojć [13-16] na poziomie 32,4 do 38,7%, a nawet 52%.

Dodatek substancji powierzchniowo czynnych wywoływał spadek aktywności oddechowej osadu o 15,5 i 16,5% przy stężeniach odpowiednio 20 i 50 mg · dm⁻³ (tab. 1). Mimo tego hamującego działania, po 24 godzinach od dodania surfaktantów morfologia osadu czynnego uległa wyraźnej poprawie, nie doszło również do zaniku mikrofauny, która odgrywa istotną rolę w procesach realizowanych przez osad czynny i może stanowić obiekt badań bioindykacyjnych [17-19]. Wpływ środków powierzchniowo czynnych na aktywność oddechową osadu czynnego badali wcześniej Liwarska-Bizukojć i in. [12], którzy zaobserwowali hamowanie aktywności dehydrogenaz biomasy osadu czynnego zarówno przez anionowe, jak i niejonowe surfaktanty.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej serii eksperymentów można stwierdzić, iż:

1. Wprowadzenie roztworu biosurfaktanta Reco 10 do zawiesiny osadu czynnego nie spowodowało zmian w indeksie objętościowym osadu.
2. Dodatek biosurfaktanta spowodował po 24 godzinach poprawę spójności kłaczków, wzrost ich gęstości i regularności kształtów.
3. Biosurfaktant Reco 10 wykazał silne lityczne oddziaływanie na bakterie nitkowate. Liczebność bakterii nitkowatych w kłaczkach osadu czynnego w wyniku działania biosurfaktanta Reco 10 zmniejszyła się w porównaniu z kontrolą po 24 godzinach działania biopreparatu o 39 do 67% w zależności od stężenia surfaktanta.

4. Biosurfaktant Reco 10 zmniejszył średnie wymiary kłaczków osadu czynnego o 21 i 17% (odpowiednio 20 i 50 mg · dm⁻³).
5. Dodatek substancji powierzchniowo czynnej w stężeniu 20 i 50 mg · dm⁻³ spowodował spadek aktywności oddechowej osadu o kilkanaście procent. Mimo tego hamującego aktywność oddechową działania po 24 godzinach od dodania surfaktantów morfologia osadu czynnego uległa wyraźnej poprawie, nie doszło również do zaniku mikrofauny.

Wyniki badań potwierdzają, że możliwe jest zastosowanie biodegradowalnych środków powierzchniowo czynnych do poprawy struktury i funkcjonowania osadu czynnego. Dobór najskuteczniejszych substancji oraz opracowanie metody ich dawkowania wymaga prowadzenia dalszych badań w tym temacie.

Literatura

- [1] Eikelboom DH, van Buijsen HJJ. Podręcznik mikroskopowego badania osadu czynnego. Szczecin: Wyd Seidel-Przywecki; 1999.
- [2] Joshi S, Bharucha C, Jha S, Yadav S, Nerurkar A, Desai AJ. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour Technol.* 2008;99:195-199. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.12.010.
- [3] Cha M, Lee N, Kim M, Kim M, Lee S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. *Bioresour Technol.* 2008;99:2192-2199. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.035.
- [4] Davis DA, Lynch HC, Varley J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enzyme and Microbial Technol.* 1999;25:322-329. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00048-4.
- [5] Wang X, Gong L, Liang S, Han X, Zhu C, Li Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae.* 2005;4:433-443. DOI: 10.1016/j.hal.2004.06.001.
- [6] Huang X, Liu J, Lu L, Wen Y, Xu J, Yang D, Zhou Q. Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-demulsifier produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresour Technol.* 2009;10:1358-1365. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.08.004.
- [7] Bednarski W. Co wiemy o biosurfaktantach? *Wiadomości Uniwersyteckie UWM.* 2007;4(94):10.
- [8] Uysal A, Türkman A. Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor. *Process Biochem.* 2005;40:2745-2749. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.12.026.
- [9] Kitatsuji K, Miyata H, Fukase T. Isolation of microorganisms that lyse filamentous bacteria and characterization of the lytic substance secreted by *Bacillus polymyxa*. *J Ferment Bioeng.* 1996;82:323-327. DOI: 10.1016/0922-338X(96)89144-6.
- [10] Jeneil Biosurfactant CO., LLC, Surfactant Data sheet for Reco-15, 6/29/2006.
- [11] Fiałkowska E, Fyda J, Pajdak-Stós A, Wiąckowski K. Osad czynny: biologia i analiza mikroskopowa. Kraków: Oficyna Wydawnicza „Impuls”; 2005.
- [12] Liwarska-Bizukojć E, Drews A, Kraume M. Effect of selected nonionic surfactants on the activated sludge morphology and activity in a batch system. *J Surfact. Deterg.* 2008;11:159-166. DOI: 10.1007/s11743-008-1066-6.
- [13] Liwarska-Bizukojć E. Oddziaływanie anionowych i niejonowych surfaktantów na osad czynny. *Zesz Nauk Rozprawy Nauk Politech Łódzka.* 2008;370:6-166.
- [14] Liwarska-Bizukojć E, Bizukojć M. Estimation of the impact of anionic surfactants on activated sludge flocs morphology in batch system. *Arch Environ Protect.* 2008;34(4):25-34.
- [15] Liwarska-Bizukojć E, Bizukojć M. Effect of selected anionic surfactants on activated sludge flocs. *Enzyme Microbial Technol.* 2006;39:660-668. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.020.
- [16] Liwarska-Bizukojć E, Bizukojć M. The influence of the selected nonionic surfactants on the activated sludge morphology and kinetics of the organic matter removal in the flow system. *Enzyme Microbial Technol.* 2007;41:26-34. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.11.016.
- [17] Klimowicz H. Znaczenie mikrofauny przy oczyszczaniu ścieków osadem czynnym. Warszawa: IKS; 1983.
- [18] Chomczynska M, Montusiewicz A, Malicki J, Łągód G. Application of Saprobes for bioindication of wastewater quality. *Environ Eng Sci.* 2009;26(2):289-295. DOI: 10.1089/ees.2007.0311.

- [19] Łagód G, Chomczynska M, Montusiewicz A, Malicki J, Bieganowski A. Proposal of measurement and visualization methods for dominance structures in the saprobe communities. *Ecol Chem Eng S.* 2009;16(3):369-377.

EFFECT OF BIOSURFACTANT RECO 10 ON THE MORPHOLOGY OF ACTIVATED SLUDGE

Faculty of Environmental Engineering, Lublin University of Technology

Abstract: The final effect of biological treatment plant operation depends on the separation efficiency of the activated sludge from treated wastewater. Sludge sedimentation properties related to size, shape and density of flocs, may be deteriorated as a result of excessive growth of filamentous bacteria or accumulation of hydrated extracellular polymers. In search of selectively and environmentally safe substances able to reduce the size of filamentous organisms the impact of biosurfactant Reco 10 on the morphology of activated sludge was examined. Immediately after application of surfactant into the activated sludge suspension, there were no changes in the index of sludge volume. However, after 24 hours of incubation, the number of filamentous bacteria per activated sludge floc decreased by 39 to 67% depending on the surfactant concentration. At concentrations 20 and 50 mg · dm⁻³ of Reco 10 almost 20% inhibition of respiration calculated on the base of the increase of CO₂ concentration was observed. Nevertheless after 24 hours of incubation with 10 Reco the activated sludge morphology (the increase of cohesion, density and regularity of flocs shape) has been significantly improved, despite a reduction in medium-sized clusters of up to 21 and 17%. No losses of microfauna (protozoa and rotifers) were observed. The results confirm that it is possible to use biodegradable surfactant to improve the structure of activated sludge.

Keywords: activated sludge, flock morphology, biosurfactant