

Małgorzata WORWAŃ¹, January BIEN¹ i Iwona ZAWIEJA¹

ZESPOŁY MIKROORGANIZMÓW W PROCESACH BEZTLENOWEJ STABILIZACJI OSADÓW

COMPLEXES OF MICROORGANISMS IN THE OXYGEN-FREE STABILIZATION PROCESSES OF SEWAGE SLUDGE

Abstrakt: Fermentacja metanowa jest to złożony proces przebiegający przy udziale zróżnicowanych populacji drobnoustrojów pod względem pokarmowym, ale synergistycznie zależnych od siebie. Związki makromolekularne rozkładane są do związków prostych, stanowiących substrat dla bakterii fermentacji metanowej, które następnie produkują wodór, alkohole oraz lotne kwasy tłuszczowe (LKT). LKT są zużywane przez bakterie syntroficzne z wytworzeniem octanu i wodoru. Octan może być także produkowany z wodoru i ditlenku węgla przez niektóre bakterie homoacetogenne oraz bakterie redukujące siarczany czy inne mikroorganizmy beztlenowe. Wodór, octan i inne składniki wykorzystywane są przez bakterie metanogenne do produkcji metanu. Charakterystyka zbiorowisk mikroorganizmów fermentacji metanowej pozwala na prześledzenie zmian i aktywności populacji drobnoustrojów. Substratem do badań był nadmierny osad czynny pochodzący z Konięcpolskich Zakładów Płyt Piłśniowych „Koniecpol” S.A., zaszczerpiiony osadem prefermentowanym, pobranym z komunalnej oczyszczalni ścieków „WARTA” w Częstochowie. Mieszaninę poddano 25-dniowej mezofilowej fermentacji metanowej. Badania prowadzono w kolbach laboratoryjnych umieszczonych w stacji do hodowli beztlenowych BACTRON w temperaturze 37°C. Zawartość badanych kolb mieszano co kilka godzin ręcznie. W celu poznania zakresu zmian liczbowych zbiorowisk mikroorganizmów, biorących udział w beztlenowej stabilizacji osadów ściekowych, w trakcie trwania procesu, codziennie dokonywano oznaczeń biologicznych na podłożu selektywnym, a także pomiaru odczynu pH mieszaniny osadów ściekowych wewnątrz stacji BACTRON w warunkach beztlenowych. W zakresie analiz mikrobiologicznych przeprowadzono również obserwacje mikroskopowe za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Przed oraz po fermentacji metanowej dokonywano analizy fizyczno-chemicznej mieszaniny, mianowicie: suchej masy, suchej masy organicznej i mineralnej, zasadowości ogólnej, ChZT, LKT, azotu Kjeldahla, azotu amonowego, węgla ogólnego.

Słowa kluczowe: stabilizacja beztlenowa, mikroorganizmy beztlenowe, osady ściekowe

Składowanie osadów ściekowych na składowiskach lub ich przyrodnicze wykorzystanie należy poprzedzić procesami przemiany, które wyeliminują uciążliwości wynikające z ich rozkładu, a także zapobiegną mikrobiologicznemu rozkładowi [1]. Stabilizacja beztlenowa jest procesem wielofazowym. Poszczególne jego fazy są prowadzone przez różne mikroorganizmy. Mikroorganizmy te wymagają odmiennych warunków środowiskowych [2]. Bakterie występujące w fermentacji „kwaśnej” należą do obligatoryjnych i fakultatywnych beztlenowców o liczebności populacji w procesie fermentacji mezofilowej $10^8 \div 10^9/\text{cm}^3$. Do najczęściej występujących podczas stabilizacji beztlenowej mikroorganizmów należą: *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Lactobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* i *Streptococcus*. Szybkość wzrostu bakterii fermentacji „kwaśnej” jest zależna od rodzaju oraz stężenia substratu. Bakterie tej fazy są stosunkowo mało podatne na wpływ temperatury i zmiany pH [3, 4].

Bakterie fazy octanowej mają bardzo długi czas generacji. Bakterie metanowe należą do obligatoryjnych beztlenowców i są trudne do wyizolowania. Morfologicznie są bardzo zróżnicowane. Każdy gatunek jest ściśle wyspecjalizowany i bierze udział w rozkładzie

¹ Instytut Inżynierii Środowiska, Wydział Inżynierii i Ochrony Środowiska, Politechnika Częstochowska, ul. Brzeźnicka 60a, 42-200 Częstochowa, tel. 34 325 73 34

wąskiej grupy związków chemicznych, produktów pierwszej fazy rozkładu. Zarówno w naturze, jak i w komorach fermentacyjnych występują w postaci pałeczek (*Methanobacterium*), spirali (*Methanospirillum*) oraz innych kształtów - np. ziarniaki czy pakietowce (*Methanococcus*, *Methanosarcina*). Mikroorganizmy te są bardzo wrażliwe na zmiany fizykochemiczne środowiska. Wraz ze wzrastającą temperaturą procesu fermentacji obserwuje się wzrost szybkości rozwoju mikroorganizmów, jednak zbyt częste wahania temperatury o ponad 2°C mogą być przyczyną zaburzeń tego procesu. Również zmiana pH poniżej 6 lub powyżej 8 powoduje zahamowanie ich rozmnażania. Rozwój bakterii jest wtedy trudny i powolny [3, 4]. Do mezofilnych bakterii metanogennych należą: *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter arboriphilus*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosphaera stadtmaniae*, *Methanococcus vannielii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina vacuolata* (minimalny wzrost wykazuje w temperaturze $\geq 18^{\circ}\text{C}$) i *Methanotherix soehngenii* (minimalny wzrost wykazuje w temperaturze $\geq 3^{\circ}\text{C}$).

Część doświadczalna

Substrat badań

Do badań wykorzystano osady pochodzące z biologiczno-mechanicznej oczyszczalni ścieków Koniecpolskich Zakładów Płyt Piłśniowych „Koniecpol” S.A. oczyszczającej ścieki składające się w 23% ze ścieków technologicznych oraz w 77% ze ścieków bytowo-gospodarczych. Udział ścieków technologicznych w ogólnym ładunku zanieczyszczeń organicznych dopływających ze ściekami do oczyszczalni stanowi przeważającą część, tj. ok. 74%. Osady nadmierne zaszczerpiono osadem przefermentowanym (*inoculum*), pobranym sprzed pras filtracyjnych Oczyszczalni Ścieków „Warta” S.A. w Częstochowie w stosunku 10:1. Mieszanina osadów przemysłowych i bytowo-gospodarczych stanowiła podstawowy substrat badań.

Metodyka badań [5, 6]

Przygotowaną mieszaninę osadów poddano 25-dniowej mezofilowej fermentacji metanowej. Badania prowadzono w czterech kolbach laboratoryjnych (stanowiących model komory fermentacyjnej) o pojemności 300 cm³ umieszczonych w inkubatorze znajdującym się w stacji do hodowli beztlenowych BACTRON III-2 (rys. 1) w temperaturze 37°C. Zawartość badanych kolb mieszano co kilka godzin ręcznie.

W celu określenia zakresu zmian liczbowych zbiorowisk mikroorganizmów, biorących udział w beztlenowej stabilizacji osadów ściekowych, w trakcie trwania procesu, codziennie dokonywano posiewu na płytkach Petriego, zawierających selektywne podłoże. Następnie płytki Petriego inkubowano w temperaturze 37°C wewnątrz stacji BACTRON III-2 w warunkach beztlenowych. Po pięciodniowej inkubacji liczone wyrosłe kolonie mikroorganizmów, a następnie prowadzono ich obserwację pod mikroskopem Olympus BX51 (rys. 2) w świetle widzialnym oraz fluorescencją. Przygotowywano preparaty mikroskopowe z wybranych kolonii i przy różnych powiększeniach, w tym imersji (100x) określano kształty mikroorganizmów fermentacji metanowej, będących w różnych stadiach procesu. Poza codzienną analizą mikrobiologiczną dokonywano również pomiaru odczynu

pH mieszaniny osadów ściekowych kolb fermentacyjnych umieszczonych w inkubatorze BACTRON III-2.

Przed oraz po fermentacji metanowej przeprowadzono analizy fizyczno-chemiczne mieszaniny, obejmujące takie parametry, jak: sucha masa, sucha masa organiczna i mineralna, zasadowość ogólna, ChZT, LKT, azot Kjeldahla, azot amonowy i węgiel ogólny [7-14].



Rys. 1. Urządzenie BACTRON III-2: rękawy (1), śluza (2), sterownik (3), inkubator (4)
Fig. 1. BACTRON III-2 station: manches (1), lock (2), controller (3), incubator (4)



Rys. 2. Mikroskop Olympus BX51
Fig. 2. Microscope Olympus BX51

Wyniki badań

W tabeli 1 zestawiono wyniki analizy fizyczno-chemicznej przed oraz po procesie fermentacji metanowej, prowadzonej w kolbach laboratoryjnych umieszczonych w stacji do hodowli beztlenowych BACTRON III-2. Podczas procesu fermentacji metanowej odnotowano prawie 40% efektywność zmniejszenia ChZT. Stosunek lotnych kwasów tłuszczowych do zasadowości przed procesem fermentacji wynosił 0,57, natomiast w 25 dniu osiągnął wartość 1,15.

Charakterystyka fizyczno-chemiczna mieszaniny fermentacyjnej

Tabela 1

Characteristic the physical and chemical of the mixture fermentation

Table 1

Wskaźnik	Jednostka	0 dzień fermentacji	25 dzień fermentacji
Zasadowość	[mg CaCO ₃ /dm ³]	320	450
ChZT	[mg O ₂ /dm ³]	809	490
Efektywność zmniejszenia ChZT	[%]	39,43	
Lotne kwasy tłuszczowe (LKT)	[mg CH ₃ COOH/dm ³]	214,2	520
LKT/Zasadowość	[mg CH ₃ COOH/ mg CaCO ₃]	0,57	1,15
Azot Kjeldahla	[mg N/dm ³]	145	220
Azot amonowy	[mg N-NH ₄ ⁺ /dm ³]	126	168
Węgiel ogólny	[mg/g]	440,95	220

W tabeli 2 przedstawiono analizę: suchej masy, suchej masy organicznej i mineralnej przed oraz po procesie fermentacji.

Charakterystyka fizyczno-chemiczna mieszaniny fermentacyjnej

Tabela 2

Characteristic the physical and chemical of the mixture fermentation

Table 2

	Wskaźnik	Jednostka	0 dzień fermentacji	25 dzień fermentacji
s.m.	Mieszanina I	[g/dm ³]	10,21	8,74
	Mieszanina II	[g/dm ³]	10,73	6,92
	Mieszanina III	[g/dm ³]	10,72	7,21
	Mieszanina IV	[g/dm ³]	10,39	7,89
s.m. organiczna	Mieszanina I	[g/dm ³]	7,66	4,56
	Mieszanina II	[g/dm ³]	7,63	4,25
	Mieszanina III	[g/dm ³]	7,74	4,53
	Mieszanina IV	[g/dm ³]	7,72	5,32
s.m. mineralna	Mieszanina I	[g/dm ³]	2,55	2,18
	Mieszanina II	[g/dm ³]	3,1	2,67
	Mieszanina III	[g/dm ³]	2,98	2,68
	Mieszanina IV	[g/dm ³]	2,67	2,37

Na podstawie wartości suchej masy organicznej przed oraz po fermentacji wyznaczono stopień przefermentowania (tab. 3). Najniższy stopień przefermentowania uzyskano dla Mieszaniny IV (31,1%), natomiast najwyższy dla Mieszaniny II (44,3%). Średnia wartość dla wszystkich badanych mieszanin wynosiła 39,3%.

Stopień przefermentowania badanego osadu

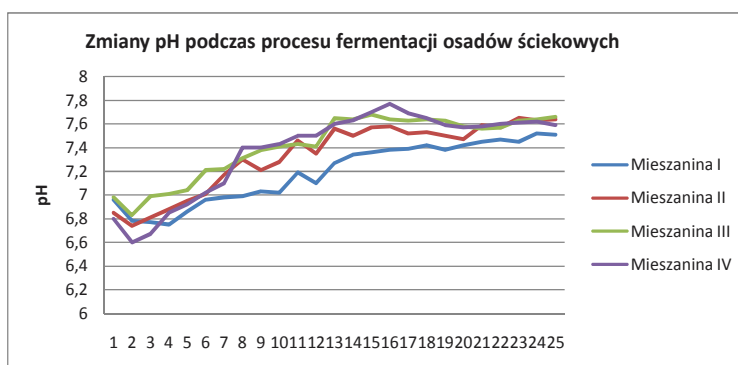
Tabela. 3

The degree of sewage sludge digestion

Table 3

Stopień przefermentowania	[%]
Mieszanina I	40,4
Mieszanina II	44,3
Mieszanina III	41,5
Mieszanina IV	31,1
średnia	39,3

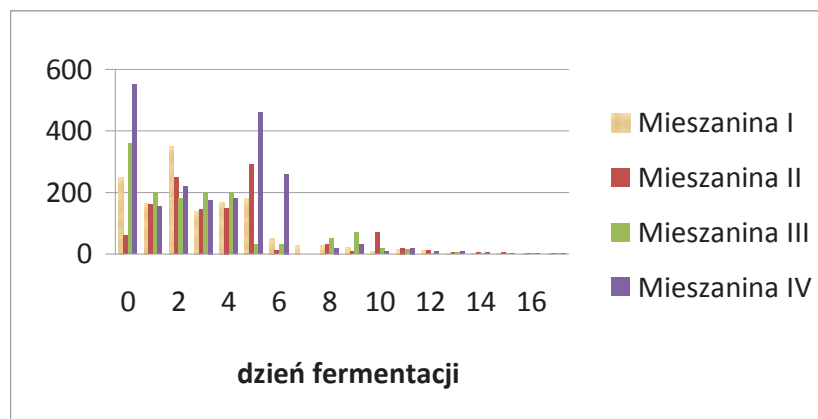
Odczyn ma zasadniczy wpływ na rozwój mikroorganizmów fermentacji metanowej, a zależy on głównie od ilości lotnych kwasów tłuszczowych w procesie. Na wykresie (rys. 3) przedstawiono zmiany pH poszczególnych mieszanin fermentacyjnych w trakcie trwania 25-dniowej stabilizacji beztlenowej. Zaobserwowano podobny przebieg zmiany pH dla poszczególnych mieszanin. Jego zauważalny spadek w I etapie procesu jest wynikiem szybkiego rozkładu substancji organicznych do niższych kwasów organicznych.



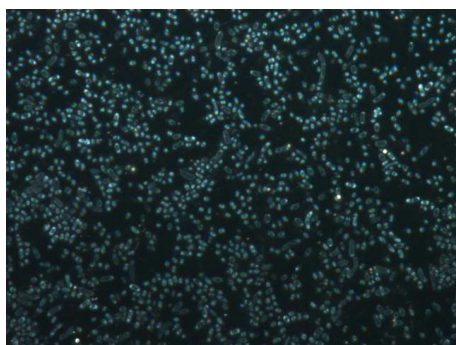
Rys. 3. Zmiany pH podczas procesu stabilizacji beztlenowej osadów ściekowych pochodzących z przemysłu celulozowego dla poszczególnych mieszanin

Fig. 3. Changes of pH value during anaerobic fermentation of sewage sludge coming from pulp mill industry to examined mixture

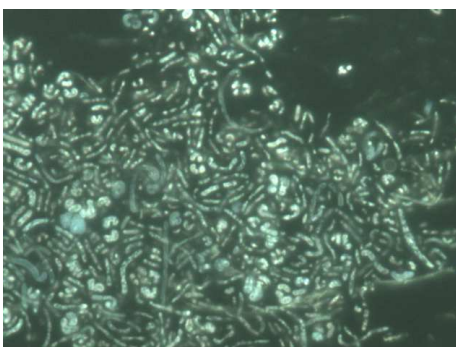
Na rysunku 4 przedstawiono analizę ilościową mikroorganizmów procesu fermentacji podaną dla rozcieńczenia 10^3 . Liczebność mikroorganizmów przez pierwsze 6 dni procesu utrzymywała się na średnim poziomie 280 jtk/cm^3 dla rozcieńczenia 10^3 . W kolejnym dniu procesu zaobserwowano znaczny spadek jtk. W kolejnych dniach nastąpił niewielki wzrost liczby jtk, po czym liczba mikroorganizmów stopniowo malała do szesnastego dnia procesu, po którym nie stwierdzono obecności mikroorganizmów.



Rys. 4. Ilościowa analiza mikroorganizmów biorących udział w fermentacji metanowej dla rozcieńczenia 10^3
 Fig. 4. The quantitative analysis of the examined microorganisms during fermentation for dilution 10^3



Rys. 5. Zdjęcie mikroorganizmów przy obiektywie 100x (imersji) w świetle widzialnym
 Fig. 5. Photo microorganism at objective x100 in visible light



Rys. 6. Zdjęcie mikroorganizmów przy obiektywie 100x (imersji) i filtrami do fluorescencji w szerokopasmowym świetle UV
 Fig. 6. Photo microorganism at objective x100 and filters to fluorescence in broadband light UV

W kolejnym etapie badań dokonano obserwacji mikroskopowych wyrosłych kolonii. W skład obserwowanych zbiorowisk wchodziły konsorcja różnych gatunków mikroorganizmów. Ponadto mikroorganizmy beztlenowe charakteryzują się świeceniem (rys. rys. 5 i 6).

Podsumowanie

Celem prowadzonych badań było określenie zmian liczebności zbiorowisk mikroorganizmów biorących udział w fermentacji beztlenowej osadów ściekowych pochodzących z Biologicznej Oczyszczalni Ścieków Konieczpolskich Zakładów Płyt Piłśniowych „Konieczpol” S.A. Uzyskane wyniki badań wykazały, że zbiorowiska mikroorganizmów charakteryzowały się dużą zmiennością liczebności w czasie procesu stabilizacji beztlenowej. W skład zbiorowisk wchodziły konsorcja różnych gatunków mikroorganizmów. Wyniki analizy wybranych parametrów fizyczno-chemicznych mieszanin fermentacyjnych były porównywalne z wynikami uzyskanymi dla samych osadów komunalnych. Może to wynikać z niewielkiej ilości osadu celulozowego w badanej mieszaninie.

Podziękowania

Badania zostały przeprowadzone w ramach BG 401/403/07/R oraz BS 401/301/08/R.

Literatura

- [1] Skalmowski K.: Poradnik gospodarowania odpadami. Wyd. VERLAG DASHOFER, Warszawa 1999.
- [2] Sadecka Z.: Toksyczność i biodegradacja insektycydów w procesie fermentacji metanowej osadów ściekowych. Uniwersytet Zielonogórski, Zielona Góra 2002.
- [3] Heinrich Z. i Nieścier A.: Stabilizacja beztlenowa osadów ściekowych, monografie nr 4: Wodociągi i kanalizacja. Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych, Warszawa 1999.
- [4] Bień J.: Osady ściekowe - teoria i praktyka. Wyd. Polit. Częstochowskiej, Częstochowa 2007.
- [5] Bień J., Matysiak B. i Wystalska K.: Stabilizacja i odwadnianie osadów ściekowych. Wyd. Polit. Częstochowskiej, Częstochowa 1999.
- [6] Choromański P. i Łebkowska M.: *Badania mikrobiologiczne w procesie fermentacji metanowej*. Gaz, Woda i Techn. Sanit. 2008, (11), 19-23.
- [7] Polskie Normy (PN-91/C-04540/05), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.
- [8] Polskie Normy (PN-EN-12879), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.
- [9] Polskie Normy (PN-75/C-04616/04), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.
- [10] Polskie Normy (PN-74/C-04540/00), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.
- [11] Polskie Normy (PN-74/C-04540/00), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.
- [12] Polskie Normy (PN- 74/C-04578/03), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.
- [13] Polskie Normy (PN-ISO 5664:2002), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.
- [14] Polskie Normy (PN-73/C-04576/14), Wyd. Normalizacyjne, Warszawa.

COMPLEXES OF MICROORGANISMS IN THE OXYGEN-FREE STABILIZATION PROCESSES OF SEWAGE SLUDGE

Institute of Environmental Engineering, Czestochowa University of Technology

Abstract: The methane fermentation is a sophisticated process which takes place with the participation of various populations of microorganisms in respect of culture, however, they depend on each other in a synergistic way. The macromolecular compounds are resolved into simple compounds, which are the substrates for bacteria of methane fermentation and then they produce hydrogen, alcohol, *volatile fatty acids* (VFA). VFA are used by syntrophic

bacteria with the production of acetate and hydrogen. Acetate can also be produced from hydrogen and carbon dioxide by some homoacetogenic bacteria and by bacteria which reduce sulfates or by other oxygen-free microorganisms. Hydrogen, acetate and other components are used to produce methane by methanogenic bacteria. The characteristics of microorganisms populations of methane fermentation allows to observe the changes and the activities of the microorganisms populations. The substrate of the research was the excessive activated sludge coming from Koniecpol Fibreboard Factory "Koniecpol" S.A. inoculated by fermented sludge, taken from the municipal sewage treatment plant: WARTA in Częstochowa. The mixture was later put to the 25-day mesophile methane fermentation. The research was made in the laboratory flasks, put into the oxygen-free cultures station called BACTRON in the temperature of 37°C. The content of the examined flasks was mixed every few hours by hand. In order to find out the range of the numerical changes of the microorganism complexes, taking place in oxygen-free stabilization of sewage sludge, during the process, there were made every day: the biological determinations on the selective base and the measurement of pH reaction of the mixture of sewage sludge inside the BACTRON station in oxygen-free conditions. Within the range of microbiological analyses there were also made the microscopic observations by mean of a fluorescent microscope. Before and after the methane fermentation there were made the physical and chemical analysis of the mixture, which includes the parameters: dry matter, dry organic and mineral matter, general alkalinity, COD (*chemical oxygen demand*), Kjeldahl nitrogen, ammonium nitrogen, general carbon.

Keywords: oxygen-free stabilization, oxygen-free microorganisms, sewage sludge