

Ewelina NOWICKA¹ i Alicja MACHNICKA¹

HIGIENIZACJA OSADU NADMIERNEGO SUCHYM LODEM^{*}

HYGIENISATION SURPLUS ACTIVATED SLUDGE BY DRY ICE

Abstrakt: Obecność mikroorganizmów chorobotwórczych w osadach ściekowych jest jednym z decydujących czynników wpływających na rolnicze i przyrodnicze ich wykorzystanie. Odpowiedni sposób higienizacji osadów może przyczynić się do ograniczenia występowania w nich bakterii patogennych lub całkowitej ich eliminacji. Praca przedstawia możliwość zastosowania suchego lodu do higienizacji osadu nadmiernego. Zakres badań obejmował analizy mikrobiologiczne i fizykochemiczne osadu. Przeprowadzone analizy mikrobiologiczne wykazały higienizujące działanie suchego lodu na osad nadmierny poprzez redukcję ogólnej liczby bakterii i bakterii patogennych. Dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 ogólna liczba bakterii uległa zmniejszeniu o 76%, redukcja liczby pałeczek *Salmonella sp.* o 90%, natomiast liczba łaseczek *Clostridium perfringens* obniżyła się o 85%. Potwierdzeniem niszczącego działania suchego lodu na mikroorganizmy były wyniki analiz fizykochemicznych. Dezintegracja drobnoustrojów suchym lodem przyczyniła się do wzrostu mętności cieczy nadosadowej i uwolnienia materii organicznej. Dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 stwierdzono wzrost mętności cieczy nadosadowej o 320 mg SiO₂/dm³ oraz wzrost wartości ChZT_C o 549 mg O₂/dm³, wyrażającej uwolnienie materii organicznej do fazy płynnej.

Słowa kluczowe: osad nadmierny, suchy lód, *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*

Najczęściej stosowane procesy przeróbki osadów nie dają produktu całkowicie bezpiecznego pod względem sanitarnym, a dostające się do gleb wraz z osadami zanieczyszczenia biologiczne mogą zakłócać równowagę biocenotyczną i zagrażać zdrowiu i życiu człowieka. Najbogatsze gatunkowo są osady miejskie [1], które składają się z: bakterii, wirusów, robaków pasożytniczych, grzybów, pierwotniaków i innych mikroorganizmów. Zawierają one drobnoustroje zarówno patogenne, groźne dla człowieka, jak i saprofityczne, obojętne z sanitarnego punktu widzenia. Obecność mikroorganizmów chorobotwórczych w osadach ściekowych z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz z gatunku *Clostridium perfringens* jest jednym z decydujących czynników, jakie należy brać pod uwagę w przypadku dalszej procedury postępowania z tego rodzaju odpadem.

Ocena stanu sanitarnego osadów polega na pośrednim wnioskowaniu o zawartości bakterii chorobotwórczych oraz jaj pasożytów jelitowych i polega na oznaczaniu tzw. wskaźnika sanitarnego. Do niedawna gatunkiem będącym wskaźnikiem sanitarnym wśród bakterii była pałeczka laktozododatnia *Escherichia coli*. Obecnie, zgodnie z rozporządzeniem ministra środowiska [2] w ocenie sanitarnej wykorzystuje się nowy wskaźnik bakteryjny *Salmonella sp.* Rola pałeczek *Salmonella sp.* w patogenezie zakażeń ludzi znacznie wzrosła w ostatnich latach. *Salmonella sp.* jest m.in. przyczyną 86% spotykanych gastroenteritis [1], durów, zakażeń wielonarządowych i sepsy [3]. Jej efekt toksycznego działania wynika z uwalniania endotoksyny, będącej pod względem chemicznym lipopolisacharydem [4].

¹ Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej, Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, ul Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała, tel. 33 827 91 57, email: enowicka@ath.bielsko.pl

^{*}Praca była prezentowana podczas konferencji ECOpole' 12, Zakopane, 10-13.10.2012

Laseczką przetrwalnikującą, występującą w ściekach, osadach ściekowych, w glebie skażonej fekaliami oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt, jest *Clostridium perfringens*. Jest to bakteria ściśle beztlenowa, zdolna do przeżycia przez długi okres w środowisku ze względu na możliwość tworzenia w warunkach niekorzystnych endospor. Może wywołać zakażenia ran czy zakażenia szpitalne oraz zatrucia pokarmowe w wyniku spożywania żywności bądź wody skażonej sporami, które są odporne na temperaturę i dezynfekcję [3, 5].

Niebezpieczeństwo zakażenia środowiska przyrodniczego patogenami pochodzącymi ze ścieków zmusza jednak do poszukiwania coraz to nowych metod, służących poprawie ich stanu sanitarnego. Jedną z takich metod jest dezintegracja osadów ściekowych, która polega na bezpośrednim rozkładzie zanieczyszczeń oraz uwolnieniu do otoczenia substratu organicznego i enzymów wewnątrzkomórkowych w wyniku destrukcji mikroorganizmów [6]. Na tej podstawie ujawniła się koncepcja, dotycząca zastosowania suchego lodu do higienizacji osadu nadmiernego.

Suchy lód to zestalony ditlenek węgla w stanie stałym, który powstaje przy rozprężaniu ciekłego ditlenku węgla w warunkach normalnych (temperatura 273 K, ciśnienie 1013,25 hPa). Suchy lód jest niestabilny w temperaturze powyżej minus 78,5°C, a podczas ogrzewania nie topi się lecz sublimuje bezpośrednio do postaci gazowej.

Stosowany jest powszechnie jako środek chłodzący w laboratoriach, chłodniach przemysłowych samodzielnie lub jako składnik mieszanin oziębiających oraz zapobiega rozwojowi grzybów i bakterii, dlatego wykorzystywany jest do transportowania szybko psujących się produktów spożywczych [7].

Celem przeprowadzonych badań było wykazanie destrukcyjnego działania suchego lodu na strukturę osadu ściekowego objawiającego się higienizacją, uwolnieniem materii organicznej oraz zmianą mętności cieczy nadosadowej.

Materiał i metoda

Materiałem do badań był osad czynny nadmierny pochodzący z oczyszczalni ścieków, stosującej zaawansowane procesy biologicznego oczyszczania ścieków, polegającej na równoczesnym usuwaniu związków organicznych oraz związków azotu i fosforu. Oczyszczalnia została zaprojektowana dla przepływu 120 000 m³/d. Obecnie ilość dopływających ścieków wynosi ok. 90 000 m³/d, czas zatrzymania ścieków ok. 14 dni, a stężenie osadu czynnego w bioreaktorze ok. 4500 mg/dm³.

Do higienizacji/dezintegracji osadu nadmiernego zastosowano stosunek objętościowy osadu nadmiernego do suchego lodu, tj.: 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1.

Próbki osadu nadmiernego do analiz mikrobiologicznych pobierano do szklanych, szczelnie zamykanych pojemników o objętości 250 cm³. Pojemniki przed pobraniem próbek poddawano 30-minutowej sterylizacji w autoklawie przy temperaturze 121°C i ciśnieniu 0,1 MPa. Materiał dostarczano do laboratorium w czasie 15 do 30 minut od momentu pobrania.

Wykonano analizy w osadzie nadmiernym przed i po procesie higienizacji suchym lodem na obecność bakterii z rodzaju *Salmonella* i *Clostridium perfringens*. Oznaczenia drobnoustrojów przeprowadzono według procedury Project Routes (2011-2014)

[8]. Badania dotyczyły również ogólnej liczby bakterii znajdujących się w osadzie nadmiernym przed i po jego destrukcji suchym lodem.

Jako podłoża hodowlane wykorzystano: agar SMS, Hektoen Enteric Agar, Nutrient Agar i SPS agar. W celu sprawdzenia przynależności taksonomicznej bakterii *Salmonella* sp. wykorzystano test biochemiczny API 20E i test MUCAP.

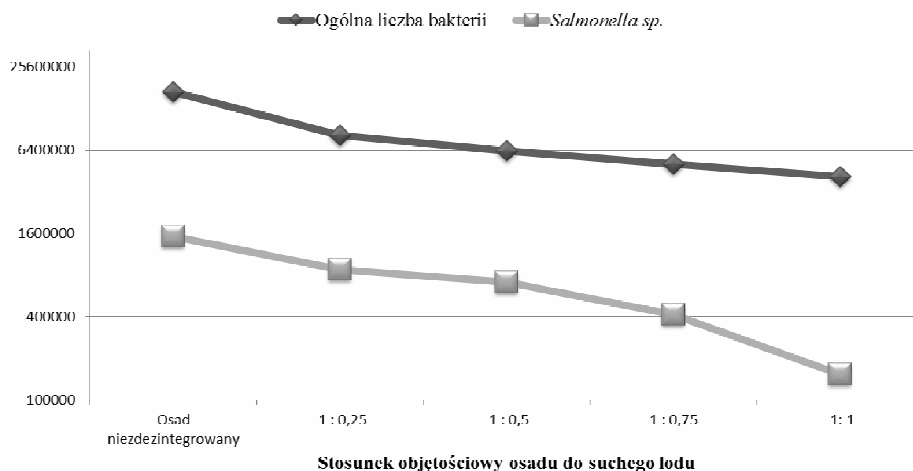
Przedstawiona graficznie liczebność bakterii w 1 g osadu nadmiernego przed i po procesie higienizacji suchym lodem była średnią arytmetyczną z trzech serii badawczych.

W próbkach osadu nadmiernego przed i po procesie dezintegracji suchym lodem oznaczono mętność cieczy nadosadowej i wartość $ChZT_{Cr}$ wyrażającą uwolnienie materii organicznej do fazy płynnej. Analizy fizykochemiczne wykonano zgodnie z metodyką zawartą w Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 19th Edition [9].

Wyniki i dyskusja

Zastosowany suchy lód powodował zniszczenie mikroorganizmów, a tym samym przyczynił się do częściowej higienizacji osadu nadmiernego, o czym świadczą uzyskane wyniki analiz mikrobiologicznych (rys. 1 i 2). W osadzie nadmiernym niepoddanym higienizacji suchym lodem ogólna liczba bakterii wynosiła 16 790 610 jtk/g s.m.o. (rys. 1) a dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 liczba ta uległa redukcji o 12 684 266 jtk/g s.m.o. (rys. 1).

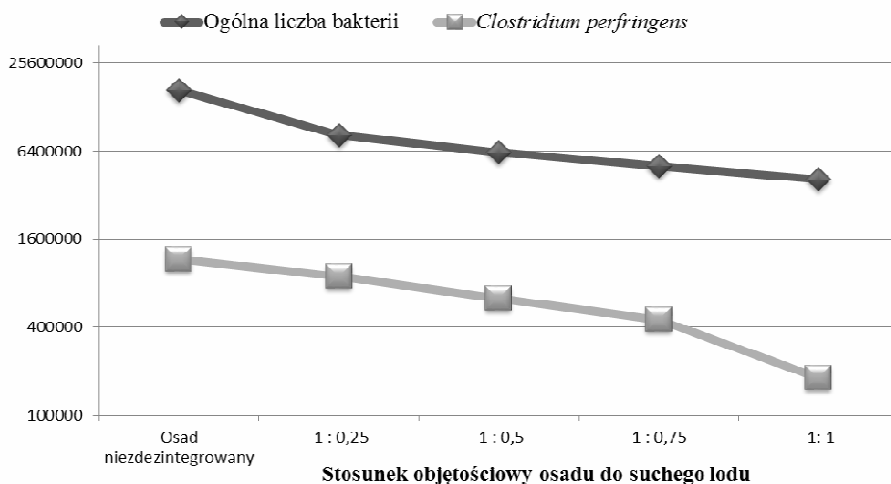
Suchy lód oddziaływał niszcząco na bakteryjny wskaźnik oceny sanitarnej osadów ściekowych. Liczebność pałeczek z rodzaju *Salmonella* w 1 g osadu nadmiernego niepoddanego higienizacji suchym lodem wynosiła 1 515 170 jtk/g s.m.o. (rys. 1), natomiast po procesie higienizacji dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, liczba ta zmniejszyła się o 1 361 410 jtk/g s.m.o. (rys. 1).



Rys. 1. Ogólna liczba bakterii i bakterii z rodzaju *Salmonella* (jtk) w 1 g osadu nadmiernego przed i po procesie higienizacji suchym lodem

Fig. 1. Total number of bacteria and bacteria of the genus *Salmonella* (cfu) in 1 g of surplus activated sludge before and after hygienization dry ice

Na podstawie badań mikrobiologicznych stwierdzono stopniową eliminację bakterii *Clostridium perfringens* spowodowaną wzrostem stosunku objętościowego suchego lodu do osadu. Liczebność laseczek *Clostridium perfringens* w osadzie niepoddanym higienizacji suchym lodem wynosiła 1 164 001 jtk/g s.m.o. (rys. 2), natomiast po procesie higienizacji dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 liczba ta uległa zmniejszeniu o 983 797 jtk/g s.m.o. (rys. 2).



Rys. 2. Ogólna liczba bakterii i bakterii *Clostridium perfringens* (jtk) w 1 g osadu nadmiernego przed i po procesie higienizacji suchym lodem

Fig. 2. Total number of bacteria and bacteria *Clostridium perfringens* (cfu) in 1 g of surplus activated sludge before and after hygienization dry ice

Przyczyną śmierci drobnoustrojów podczas mrożenia były mechaniczne uszkodzenia komórek oraz szok osmotyczny. Mechaniczne uszkodzenia były spowodowane tworzeniem się kryształów lodu w środowisku otaczającym komórki i w ich wnętrzu. Zwiększające się w procesie mrożenia zewnątrzkomórkowe kryształy niszczyły występujące między nimi komórki drobnoustrojów [10, 11]. Tworzenie się kryształów międzykomórkowych powodowało uszkodzenia biomembran lub zmianę ich właściwości, co prowadziło do uwolnienia substancji wewnątrzkomórkowych do środowiska.

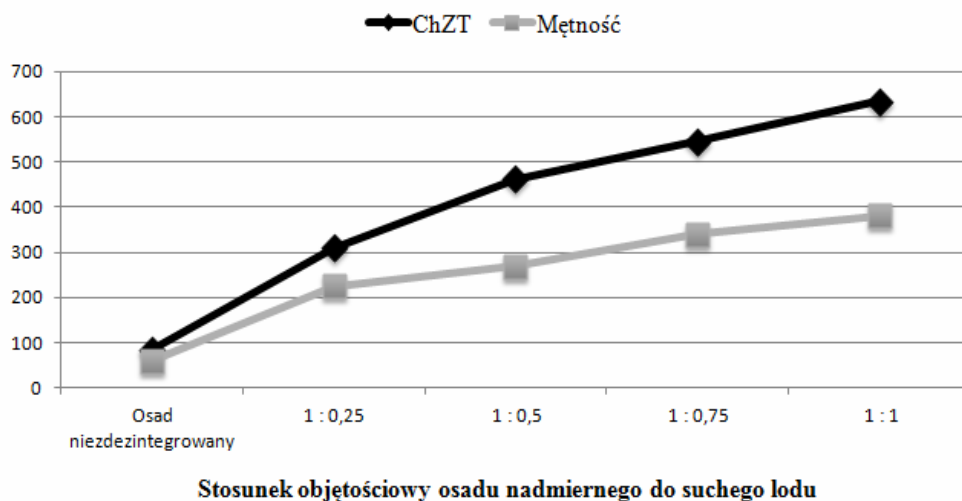
Uzyskane wyniki mikrobiologiczne pozwalają konkludować, że higienizacja suchym lodem może stać się nową, korzystną metodą udoskonalania procesów higienizacji osadów ściekowych.

Potwierdzeniem niszczącego działania suchego lodu na mikroorganizmy były uzyskane wyniki analiz fizykochemicznych.

Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem powodowała uwolnienie materii organicznej wyrażonej wartością $ChZT_{Cr}$ (rys. 3). W cieczy nadosadowej osadu nadmiernego niepoddanego dezintegracji suchym lodem wartość $ChZT_{Cr}$ wynosiła

85 mg O₂/dm³ (rys. 3), natomiast po dezintegracji dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 wartość ChZT_{Cr} wzrosła do 634 mg O₂/dm³ (rys. 3).

Zniszczenie mikrobiologicznej struktury łańczków suchym lodem przyczyniło się do wzrostu mętności fazy płynnej osadu głównie na skutek uwolnienia substancji wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowych polimerów (rys. 3). W osadzie nadmiernym niepoddanym dezintegracji suchym lodem mętność cieczy nadosadowej wynosiła 60 mg SiO₂/dm³ (rys. 3), a po procesie destrukcji, dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, uległa zwiększeniu o 320 mg SiO₂/dm³ (rys. 3).



Rys. 3. Uwolniona materia organiczna (wyrażona jako ChZT_{Cr}) oraz wzrost mętności cieczy nadosadowej przed i po procesie dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem

Fig. 3. The released organic matter (expressed as COD_{Cr}) and increase in turbidity of the liquid supernatant before and after the disintegration surplus activated sludge of dry ice

Wnioski

1. Przeprowadzona destrukcja osadu nadmiernego suchym lodem przyczyniła się do zmniejszenia ogólnej liczby bakterii i bakterii patogennych, a tym samym do częściowej higienizacji osadu nadmiernego. Ogólna liczba bakterii w 1 g osadu dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 uległa redukcji o 76%, liczba pałeczek *Salmonella sp.* zmniejszyła się o 90%, natomiast liczba laseczek *Clostridium perfringens* obniżyła się o 85%.
2. Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem spowodowała uwolnienie materii organicznej do fazy płynnej i wzrost mętności cieczy nadosadowej. Wartość ChZT_{Cr} wzrosła o 549 mg O₂/dm³, natomiast mętność cieczy o 320 mg SiO₂/dm³.

Literatura

- [1] Bień J. Osady ściekowe. Teoria i praktyka. Częstochowa: Wyd. Politechniki Częstochowskiej; 2007.
- [2] Rozporządzenia Ministra Środowiska (DzU 2010, Nr 137, poz. 924).
- [3] Lunn AD, Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Vila J. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates. *Internat Microbiol.* 2010;13:15-20. DOI: 10.2436/20.1501.01.107.
- [4] Schlegel GH. Mikrobiologia ogólna. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2005.
- [5] Lindström M, Heikinheimo A, Lahti P, Korkeala H. Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol.* 2011;18:192-198. DOI: 10.1016/j.fm.2010.03.020.
- [6] Grübel K, Machnicka A. Oddziaływanie promieniowania mikrofalowego na osad czynnicy. *Nauka Przyr. Technol.* 2011;5:1-9.
- [7] Jean DS, Lee DJ, Chang CY. Direct sludge freezing using dry ice. *Adv Environ Res.* 2001;5:145-150. DOI: 10.1016/S1093-0191(00)00052-6.
- [8] Project Routes (2011-2014). Novel processing routes for effective sewage sludge management. Innovative system solutions for municipal sludge treatment and management. Grant agreement n° 265156. Methodology of Detection and enumeration of spores of *Clostridium perfringens* and *Salmonella MPN* in sludge, soils and organic fertilizers: Pour plate method for quantification, University of Barcelona.
- [9] Clesceri LS, Eaton AD, Greenberg AE, Franson MA. Standard methods for the examination of water and wastewater: 19th edition supplement. Washington: American Public Health Association; 1996.
- [10] Thammavongsa B, Poncetb JM, Desmasuresa N, Guéguena M, Panoff JM. Resin straw as an alternative system to securely store frozen microorganisms. *J Microbiol Methods.* 2004;57:181-186. DOI: 10.1016/j.mimet.2004.01.003.
- [11] Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2007.

HYGIENISATION SURPLUS ACTIVATED SLUDGE BY DRY ICE

Department of Microbiology and Environmental Biotechnology
Institute for Conservation and Environmental Engineering
University of Technology and Humanities, Bielsko-Biała

Abstract: The presence of pathogenic microorganisms in sewage sludge is one of the crucial factors affecting their use in agriculture and in nature. An appropriate method of sludge hygienization can contribute to the reduction of the presence of pathogenic microbes in the sludge or to their complete elimination. This study presents the possibility of using dry ice in the hygienization of surplus activated sludge. The scope of survey covered microbiological as well as physiochemical analyses of the sludge. The microbiological analyses conducted show the hygienization effect of dry ice on surplus activated sludge such as the reduction of the total number of bacteria as well as of pathogenic bacteria. In the case of sludge to dry ice 1:1 voluminal ratio, the total number of bacteria has been reduced by 76%, the number of *Salmonella sp.* rods - by 90%, and *Clostridium perfringens* - by 85%. The results of physiochemical analyses confirmed the destructive effect that dry ice has over microorganisms. The disintegration of microbes by means of dry ice contributed to the increase of supernatant liquid turbidity and to the release of organic matter. For the sludge to dry ice 1:1 voluminal ratio, an increase in turbidity of supernatant liquid by 320 mg SiO₂/dm³ has been proven, as well as an increase in the value of COD_C by 549 mg O₂/dm³, which indicates the release of organic matter into the liquid phase.

Keywords: surplus activated sludge, dry ice, *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*