

Ewa Łobos-Moysa, Mariusz Dudziak, Michał Bodzek

Badania wpływu kwasów tłuszczowych i steroli na skuteczność oczyszczania ścieków osadem czynnym w układzie porcjowym

Oleje roślinne są mieszaniną trójglicerydów, czyli estrów glicerolu i wyższych kwasów tłuszczowych, a ponadto zawierają fitosterole, alkohole alifatyczne, węglowodory, witaminy E i K [1,2]. Kwasy tłuszczowe są nierozgałęzionymi związkami, zawierającymi w swym łańcuchu od 12 do 20 atomów węgla, które mogą być połączone wiązaniami pojedynczymi lub podwójnymi. Ze względu na rodzaj wiązania kwasy te dzielą się na nasycone i nienasycone. Wśród kwasów nasyconych najważniejszymi są palmitynowy – C16:0 i stearynowy – C18:0 [1]. W zależności od liczby wiązań podwójnych kwasy nienasycone występują jako jednonienasycone (oleinowy – C18:1) i wielonienasycone (linolowy – C18:2, linolenowy – C18:3) [1,2]. Zawartość kwasów tłuszczowych (ich rodzaj i wzajemny stosunek) w danym rodzaju oleju jest charakterystyczna i zależy od gatunku i pochodzenia rośliny oleistej oraz sposobu otrzymywania oleju (tłoczony na zimno, rafinowany) [1,3]. Skład podstawowych kwasów (palmitynowy, oleinowy i linolowy) jest bardzo istotny m.in. przy określaniu autentyczności produktu [1,4]. Również w badaniach nad stabilnością oleju i procesem jęczenia związki te brane są pod uwagę [5]. W tabeli 1 podano skład podstawowych kwasów tłuszczowych w poszczególnych olejach jadalnych [4–6].

Oleje i tłuszcze są jedną z trzech głównych grup produktów spożywczych. Będąc składnikiem diety człowieka pojawiają się w ściekach komunalnych zarówno w formie niezmięnionej, jak i zmienionej, np. po termicznej obróbce. Stanowią jeden z głównych składników substancji organicznych w ściekach komunalnych, a ich zawartość może stanowić do 25% ChZT [7,8]. Zawarte w ściekach oleje i tłuszcze ulegają biodegradacji w warunkach beztlenowych i tlenowych. Wstępna hydroliza enzymatyczna, prowadzona pozakomórkowo, umożliwi rozłożenie cząsteczki tłuszczu do glicerolu i wyższych kwasów tłuszczowych [7,9]. W warunkach beztlenowych glicerol jest degradowany do 1,3-propandiolu, a w dalszym ciągu do octanu. Kwasy długołańcuchowe ulegają natomiast powolnej degradacji do kwasów krótkołańcuchowych [10]. Problemy wynikające z biodegradacji ścieków zaolejonych w warunkach beztlenowych związane są z dwoma zjawiskami. Po pierwsze, z adsorpcją lekkiej warstwy tłuszczów wokół biomasy powodującą jej flotację i wymywanie. Po drugie, z czułością na toksyczność długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, zwłaszcza nienasyconych, zarówno bakterii

metanogennych, jak i acetogennych, dwóch głównych troficznych grup związanych z degradacją tych kwasów [7]. W warunkach tlenowych, po wstępnej hydrolizie, zachodzi β -oksydacja, polegająca na stopniowym odłączaniu od cząsteczki tłuszczu dwuwęglowych fragmentów. Końcowymi produktami w procesie tlenowym są dwutlenek węgla i woda, a beztlenowym – dwutlenek węgla i metan. Biodegradacja tłuszczów może być ograniczona przez ich nierozpuszczalność w wodzie [8].

Drugą ważną grupą związków są sterole – naturalne przeciwutleniacze [1], które wraz z izoprenoidami mogą stanowić 0,5–5% ogólnej zawartości tłuszczów [2]. Pomimo że mają strukturę pierścieniową, sterole zaliczane są również do lipidów, gdyż rozpuszczają się w alkoholu, eterze, benzynie i innych rozpuszczalnikach tłuszczowych. Występują one w pożywieniu w znacznie mniejszych ilościach niż kwasy tłuszczowe. Najczęściej są to kampesterol, stigmasterol i β -sitosterol [1].

Celem badań było określenie możliwości wykorzystania zanieczyszczeń specyficznych, tj. wyższych kwasów tłuszczowych (palmitynowy, linolowy i oleinowy) oraz steroli (stigmasterol, β -sitosterol, betulina) jako wskaźników stopnia biodegradacji ścieków zawierających oleje i tłuszcze w oczyszczalniach ścieków. W badaniach założono, że ścieki dopływające do oczyszczalni nie są zagnięte. W przypadku nagłego dopływu ścieków zaolejonych do oczyszczalni z niezaadaptowanym do tego typu zanieczyszczeń osadem czynnym, analiza jakościowo-ilościowa kwasów tłuszczowych i steroli w ściekach surowych pozwoli na oszacowanie skali problemu, natomiast przy długotrwałym dopływie do oczyszczalni tak obciążonych ścieków pozwoli na określenie momentu zachwiania procesu oczyszczania.

Część doświadczalna

W badaniach zastosowano ścieki modelowe i rzeczywiste. Ścieki modelowe, przygotowywane z bulionu wzbogaconego, skrobi, mocznika octanu sodu i związków mineralnych, pod względem składu odpowiadały ściekom bytowo-gospodarczym. Rzeczywiste ścieki bytowo-gospodarcze pochodziły z komunalnej oczyszczalni mechaniczno-biologicznej znajdującej się na terenie województwa śląskiego [11]. Do obu rodzajów ścieków przy użyciu płuczki ultradźwiękowej (InterSonic typ IS 5.5) wprowadzono emulsję olejową (0,1% obj.) przygotowywaną z oleju rzepakowego (powszechnie dostępnego w handlu produktu spożywczego). W celu hodowli osadu czynnego w warunkach laboratoryjnych przywieziony z oczyszczalni ścieków

Tabela 1. Skład podstawowych kwasów tłuszczowych w olejach roślinnych
Table 1. Composition of fatty acids in vegetable oils

Olej	Kwas tłuszczowy, %				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Rzepakowy	3,9±4,6	1,7±1,9	69,0±67,9	15,1±18,6	5,7±9,7
Słonecznikowy	2,4±8,3	1,8±3,8	23,5±33,1	53,4±65,3	0,2±2,6
Oliwa	9,9±12,7	2,6±3,2	74,3±79,6	4,3±10,0	0,3±0,8

osad wprowadzono do reaktora o objętości 15 dm³. Zastosowano niezaadaptowany do zanieczyszczeń olejowych osad czynny, który był wymieniany w każdym cyklu badań. Hodowlę osadu czynnego prowadzono w reaktorze dawkując do niego (przy użyciu pompy perystaltycznej) ścieki surowe bez emulsji olejowej z wydajnością ok. 1,5 dm³/h. Z tego reaktora pobierano porcję osadu czynnego do badań biodegradacji składników oleju. W badaniach zastosowano układ porcjowy składający się z bioreaktora o pojemności 2 dm³, mieszadeł magnetycznych (firmy IKA) oraz pompek Optima i Maxima (firmy Hagen). Bioreaktor napełniano i opróżniano jednokrotnie w ciągu doby, stosując różną proporcję ilości ścieków do osadu czynnego, uzyskując wartości obciążenia osadu ładunkiem zanieczyszczeń (mierzonych jako BZT₅) w zakresie 0,02÷0,22 gO₂/g·d [11]. W każdym cyklu ścieki modelowe wprowadzono do bioreaktora bez przetrzymywania (tj. w formie niezagniętej), natomiast ścieki rzeczywiste nieznacznie zagniwały podczas transportu. Mieszaninę napowietrzano przez 24 h, po czym wyłączo- no napowietrzanie i oddzielono osad czynny, a w ściekach oczyszczonych wykonano oznaczenia analityczne.

Ocenę skuteczności biodegradacji ścieków przeprowadzono na podstawie oznaczenia zanieczyszczeń specyficznych, tj. kwasów tłuszczowych nienasyconych – linolowego (C18:2) i oleinowego (C18:1) i nasyconych – palmitynowego (C16:0) oraz steroli – stigmasterolu, β-sitosterolu i betuliny, pochodzących głównie z wprowadzanego w postaci emulsji oleju rzepakowego. W przypadku ścieków modelowych zanieczyszczenia te pochodziły również z bulionu wzbogaconego, który jest wyciągiem mięsnym, a w przypadku ścieków komunalnych – z działalności bytowo-gospodarczej człowieka. Specyficzne mikrozanieczyszczenia w ściekach oznaczono stosując do ich wydzielenia metodę ekstrakcji, natomiast do analizy jakościowo-ilościowej ekstraktu – metodę GC-MS. W badaniach wykorzystano system analityczny Saturn 2100 T firmy Varian, w skład którego wchodził kapilarny chromatograf gazowy GC sprzężony on-line ze spektrometrem mas typu ion trap. Chromatograf wyposażono w kapilarną kolumnę chromatograficzną VF–5ms o wymiarach 30 m×0,25 mm i grubości fazy stacjonarnej 0,25 μm firmy Varian. Jako gaz nośny zastosowano hel (5 N). Temperatura pułapki jonowej i źródła jonów wynosiła 200 °C. Badane związki oznaczono po ich wcześniejszym upochodnieniu, które miało na celu zwiększenie czułości analizy. Kwasy tłuszczowe w ekstrahowano z próbki ścieków o objętości 10 cm³ i pH=1 chlorkiem metylenu (w stosunku 1:10), po wcześniejszej estryfikacji roztworem metanolu w obecności BF₃ jako katalizatora reakcji. Ekstrakt analizowano w zakresie temperatury pieca chromatograficznego od 80 °C do 250 °C (temp. dawkuownika 280 °C). Analizę ilościową prowadzono rejestrując jony w zakresie m/z=40÷300.

Do wydzielenia badanych steroli zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE) z użyciem kolumnienek LC–18 o objętości 3 cm³ (masa fazy 0,5 g) firmy Supelco. Złoże kolumnienki przed ekstrakcją kondycjonowano n-heksanem i metanolem, a następnie przepłukano wodą zdejonizowaną.

Wydzielone związki odmyto acetonem, a po odparowaniu rozpuszczalnika do sucha w strumieniu azotu poddano upochodnieniu. Do upochodnienia steroli zastosowano trójskładnikową mieszaninę reakcyjną MSTFA/TMIS/DTE w proporcjach 1000:4:2 v/v/w. Czas upochodniania wynosił 30 min, a temperatura reakcji 60 °C. Analizę jakościowo-ilościową GC-MS powstałych pochodnych steroli przeprowadzono w oparciu o metodę monitorowania wybranych jonów (SIM), w przypadku stigmasterolu o m/z=83, 129, 255, 395 i 485, β-sitosterolu – o m/z=129, 255, 358, 397 i 487 oraz betuliny – o m/z=129, 187, 203, 394 i 497. Program temperatury pieca chromatograficznego zaprogramowano w zakresie temperatur 150÷300 °C (temp. iniektora 290 °C).

Omówienie wyników badań

Wyższe kwasy tłuszczowe oraz sterole są składnikami olejów jadalnych, różnią się jednak właściwościami fizyczno-chemicznymi. Inne więc może być ich zachowanie podczas biologicznego oczyszczania ścieków, w skład których będą wchodzić.

Przedziały zawartości kwasów tłuszczowych w zakresie obciążenia osadu czynnego ładunkiem zanieczyszczeń (wyrażonych jako BZT₅) od 0,02 gO₂/g·d do 0,22 gO₂/g·d podano w tabeli 2. Stwierdzono całkowite usunięcie kwasu wielonienasyconego – linolowego (C18:2) w obu rodzajach ścieków, natomiast skuteczność usuwania pozostałych zanieczyszczeń była zróżnicowana. W przypadku kwasu jednonienasyconego – oleinowego (C18:1) mieściła się w granicach od 68% do 93% (ścieki modelowe) oraz od 90% do 91% (ścieki komunalne). Wyjątek stanowił kwas palmitynowy (C16:0), który podczas biodegradacji ścieków modelowych bez dodatku oleju został usunięty tylko w zakresie w 32÷44%. Jednocześnie w tym przypadku zawartość kwasu tłuszczowego w ściekach surowych była najmniejsza. Przy większych ilościach (ścieki modelowe z olejem) skuteczność procesu wynosiła od 66% do 95%, a dla ścieków komunalnych od 82% do 97%. Uwzględniając zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w ściekach oczyszczonych oraz ich stopień usunięcia można stwierdzić, że ulegają one biodegradacji przez osad czynny. Różnica w skuteczności ich usuwania może wynikać z faktu, iż nienasycone kwasy tłuszczowe łatwo ulegają utlenieniu (wraz ze wzrostem liczby wiązań podwójnych) [12]. Skuteczność biodegradacji była zależna od początkowej zawartości kwasów w ściekach świeżych (rys. 1). W trakcie badań modelowe ścieki zagniwały, co przyspieszało rozkład oleju, a tym samym wzrost ilości wyższych kwasów tłuszczowych. Obciążenie osadu czynnego, określające ilość rozkładalnych substancji organicznych doprowadzanych w ciągu doby, jest czynnikiem ograniczającym skuteczność procesu. Biologiczne oczyszczanie ścieków metodą osadu czynnego prowadzi się w szerokim zakresie obciążenia, jednak do całkowitego biologicznego oczyszczenia wymagane jest obciążenie <0,4 gO₂/g·d [13]. Na

Tabela 2. Zawartość wyższych kwasów tłuszczowych oraz skuteczność oczyszczania ścieków w układzie porcjowym
Table 2. Content of higher fatty acids and efficiency of wastewater treatment in a batch system

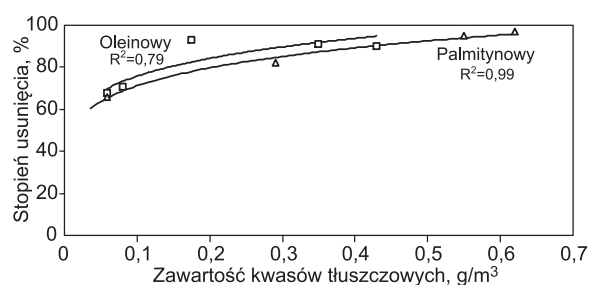
Kwas tłuszczowy	Ścieki modelowe			Ścieki modelowe + olej		
	surowe g/m ³	oczyszczone g/m ³	skuteczność %	surowe g/m ³	oczyszczone g/m ³	skuteczność %
Linolowy (C18:2)	0,021	0,000	100	0,033+0,051	0,000	100
Oleinowy (C18:1)	0,000+0,059	0,019+0,023	68	0,080+0,174	0,013+0,023	71+93
Palmitynowy (C16:0)	0,028+0,036	0,019+0,02	32+44	0,059+0,55	0,020+0,027	66+95
Kwas tłuszczowy	ścieki komunalne			ścieki komunalne + olej		
	surowe g/m ³	oczyszczone g/m ³	skuteczność %	surowe g/m ³	oczyszczone g/m ³	skuteczność %
Linolowy (C18:2)	0,033+1,702	0,000	100	0,049+1,504	0,00	100
Oleinowy (C18:1)	0,278+0,347	0,003	91	0,430+0,761	0,43	90
Palmitynowy (C16:0)	0,04+0,292	0,051	82	0,219+0,620	0,016	97

Tabela 3. Zawartość steroli oraz skuteczność oczyszczania ścieków w układzie porcjowym (* przyrost)
Table 3. Content of sterols and efficiency of wastewater treatment in a batch system

Sterol	Ścieki modelowe			Ścieki modelowe + olej		
	surowe mg/m ³	oczyszczone mg/m ³	skuteczność %	surowe mg/m ³	oczyszczone mg/m ³	skuteczność %
Stigmasterol	–	–	–	0+51	0+15	76+100*
β-sitosterol	–	–	–	0+178	0+17	90+100
Betulina	–	–	–	0+12	0	100
Sterol	Ścieki komunalne			Ścieki komunalne + olej		
	surowe mg/m ³	oczyszczone mg/m ³	skuteczność %	surowe mg/m ³	oczyszczone mg/m ³	skuteczność %
Stigmasterol	0+4070	0+39400	41,8*	90+8930	0+44	91+100
β-sitosterol	0+437	0+7090	81*	0+11400	0+79	94+100
Betulina	0+38	0	100	0+12300	0	100

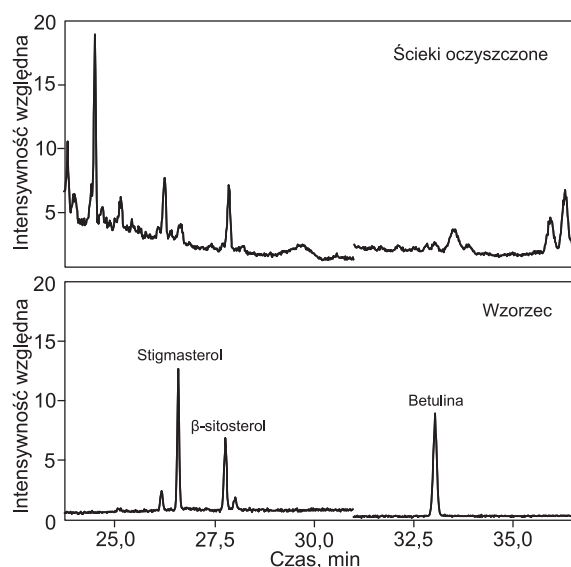
rysunku 1 przedstawiono także zależność stopnia usunięcia kwasów oleinowego i palmitynowego od stosowanego obciążenia osadu czynnego. Ograniczającą wartością obciążenia w przypadku kwasu palmitynowego okazało się zbyt niskie obciążenie, tj. <0,06 gO₂/g·d.

Sterole występowały w ściekach w znacznie mniejszych ilościach niż wyższe kwasy tłuszczowe. Chromatogram



Rys. 1. Zależność skuteczności usuwania kwasów tłuszczowych od ich początkowej ilości (>0,06 gO₂/g d) oraz obciążenia osadu czynnego ładunkiem BZT₅
Fig. 1. Efficiency of removal of fatty acids related to their initial content (>0.06 gO₂/g d) and to the BOD₅ load received by the activated sludge

steroli zawartych w ściekach komunalnych z dodatkiem oleju przedstawiono na rysunku 2. Zestawienie zawartości badanych zanieczyszczeń w ściekach surowych i oczyszczonych podczas poszczególnych cykli podano w tabeli 3. W większości przeprowadzonych cykli stwierdzono ich usunięcie, natomiast przyrost tylko w kilku cyklach. Inaczej niż w przypadku kwasów tłuszczowych, usuwanie steroli nie było zależne od ich zawartości początkowej, ani od obciążenia osadu czynnego. Głównymi mechanizmami ich usuwania były prawdopodobnie adsorpcja i bioakumulacja.



Rys. 2. Chromatogram ścieków komunalnych z dodatkiem oleju
Fig. 2. Chromatogram of municipal sewage with oil additive

W tabeli 4 podano współczynniki $\log K_{ow}$ badanych związków. Wartość $\log K_{ow} > 3$ może oznaczać właściwości bioakumulacyjne związku, zwłaszcza że zanieczyszczenia te występują również w osadach ściekowych [14, 15]

Tabela 4. Wartości współczynnika $\log K_{ow}$ kwasów tłuszczowych i steroli

Table 4. Value of the $\log K_{ow}$ coefficient of fatty acids and sterols

Związek	$\log K_{ow}^*$
kwas tłuszczowy	
Linolowy	7,51
Oleinowy	7,73
Palmitynowy	6,96
sterol	
Stigmasterol	9,43
β -sitosterol	9,65
Betulina	8,18

* w obliczeniach wykorzystano programy The logK predictor i SRC K_{ow} WIN

Podsumowanie

Analizując przebieg i skuteczność procesu oczyszczania ścieków osadem czynnym w warunkach tlenowych na podstawie usunięcia zanieczyszczeń specyficznych pochodzących z oleju rzepakowego stwierdzono biodegradację długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, przy czym stopień ich usunięcia zależny był od początkowej zawartości substratów oraz obciążenia osadu czynnego ładunkiem zanieczyszczeń. Mechanizm usuwania zanieczyszczeń występujących w olejach polegał na wstępnej hydrolizie olejów, a następnie biodegradacji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Ze względu na śladowe ilości steroli w ściekach, takich zależności, jak w przypadku kwasów tłuszczowych, nie ustalono. Wydaje się, że głównym mechanizmem ich usuwania były zjawiska oparte na procesach adsorpcji i biokumulacji.

Badania wykonano w ramach projektu badawczego nr 3 T09D 090 29 pt. „Biodegradacja w bioreaktorach membranowych wybranych kwasów tłuszczowych i steroli zawartych w ściekach bytowo-gospodarczych”, sfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Lobos-Moysa, E., Dudziak, M., Bodzek, M. Effect of Fatty Acids and Sterols on the Efficiency of Wastewater Treatment by the Activated Sludge Process in a Batch System. *Ochrona Środowiska* 2010, Vol. 32, No. 2, pp. 53–56.

Abstract: The experiments were conducted in a batch system, with a mixed microbial population of the activated sludge obtained from a municipal sewage treatment plant. The extent of biodegradation for the polluting species occurring both in the model and real wastewaters was established taking into account the variations in the content of specific pollutants, *i.e.* unsaturated fatty acids (linoleic – C18:2 and oleinic – C18:1), saturated fatty acid (palmitic – C16:0) and sterols (stigmasterol, β -sitosterol and betuline). The study produced the following findings. Removal of linoleic acid was complete with both types of wastewater. As for the other pollutants, differences were observed in the removal patterns between the two wastewater types: *e.g.*,

LITERATURA

1. R. APARICIO, R. APARICIO-RUIZ: Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography* 2000, Vol. 881, No. 1–2, pp. 93–104.
2. J. GAWĘCKI, T. MOSSOR-PIETRASZEWSKA [red.]: Kompendium wiedzy o żywności, żywieniu i zdrowiu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
3. I. JOHANSSON, M. SVENSSON: Surfactants based on fatty acids and other natural hydrophobes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 2001, Vol. 6, pp. 178–188.
4. M. WRONIAK, J. RAMOTOWSKA, M. MATUSZEWSKA, M. OBIEDZIŃSKI: Możliwość zastosowania oznaczenia izomerów trans kwasów tłuszczowych i 3,5-stigmastadienu do badania autentyczności olejów tłoczonych na zimno. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2006, vol. 47, nr 2, ss. 365–373.
5. M. WRONIAK, D. ŁUKASIK, M. MASZEWSKA: Porównanie stabilności oksydacyjnej wybranych olejów tłoczonych na zimno z olejami rafinowanymi. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość* 2006, vol. 46, nr 1, ss. 214–221.
6. M.W. BALAKOS, E.E. HERNANDEZ: Catalyst characteristics and performance in edible oil hydrogenation. *Catalysis Today* 1997, Vol. 35, pp. 415–425.
7. Y. SAATCI, E.L. ARSLAN, V. KONAR: Removal of total lipids and fatty acids from sunflower oil factory effluent by UASB reactor. *Bioresource Technology* 2003, Vol. 87, pp. 269–272.
8. X. LEFEBVRE, E. PAUL, M. MAURET, P. BAPTISTE, B. CAPDEVILLE: Kinetic characterization of saponified domestic lipid residues aerobic biodegradation. *Wastewater Research* 1998, Vol. 32, pp. 3031–3038.
9. J.A. LALMAN, D.M. BAGLEY: Anaerobic degradation and inhibitory effects of linoleic acid. *Water Research* 2000, Vol. 34, pp. 4220–4228.
10. J.A. LALMAN, D.M. BAGLEY: Anaerobic degradation and inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water Research* 2001, Vol. 35, pp. 2975–2983.
11. E. ŁOBOS-MOYSA, M. BODZEK, M. KOPYTIUK, M. MATEJA, Badania wpływu oleju roślinnego na skuteczność oczyszczania ścieków osadem czynnym. *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 4, ss. 35–38.
12. J. BEVER, A. STEIN, H. TEICHMANN, Zaawansowane metody oczyszczania ścieków. Projprzem-EKO, Bydgoszcz 1997.
13. E.Z. HARRISON, S.R. OAKES, M. HYSELL, A. HAY: Organic chemicals in sewage sludges. *Science of the Total Environment* 2006, Vol. 367, pp. 481–497.
14. M.P. FERNANDEZ, M.G. IKONOMOU, I. BUCHANAN: An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Science of the Total Environment* 2007, Vol. 373, pp. 250–269.

for oleinic acid the efficiency of removal varied from 68 to 93% in the case of the model wastewater, and from 90 to 91% in the case of the municipal sewage. Palmitic acid was an exception: its removal achieved during biodegradation of the model wastewater with no oil additive only varied between 32 and 44%. The difference in the efficiency of removal can be attributed to the readiness of unsaturated acids to undergo oxidation with the increase in the number of double bonds. The extent of biodegradation was also found to depend on the initial concentrations of the fatty acids and on the load of pollutants received by the activated sludge. In the case of sterols, whose concentrations were noticeably lower than those of fatty acids, no such relation was found to occur. Seemingly, the principal mechanism governing the removal of sterols involved adsorption and bioaccumulation.

Keywords: Wastewater treatment, aerobic process, activated sludge, edible oil, fatty acids, sterols.