

Klaudiusz Grúbel¹, Ewelina Chrobak¹,
Agnieszka Rusin², Alicja Machnicka¹

ELIMINACJA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* PODCZAS KONDYCJONOWANIA OSADU CZYNNEGO NADMIERNEGO

Streszczenie. Praca przedstawia możliwość eliminacji *Clostridium perfringens* w procesie kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego. Na podstawie wyników badań stwierdzono, że promieniowanie mikrofalowe (700W i 900W) wykazuje dezintegrujące działanie wyrażone wzrostem wartości ChZT w cieczy nadosadowej: 12-krotny wzrost wartości ChZT przy mocy 700W i 13-krotny przy mocy promieniowania 900W. Fala elektromagnetyczna przyczyniła się do częściowej higienizacji osadu. Spowodowała redukcję liczby *Clostridium perfringens* odpowiednio o 52% i 56% w czasie 120s oddziaływania, przy mocy 700W i 900W. Redukcja ogólnej liczby bakterii pod wpływem mikrofal wyniosła 42% i 51% (odpowiednio dla 700W i 900W), a pałeczek z rodziny Enterobacteriaceae od 54% do 70% w zależności od mocy promieniowania, czasu działania i własności biochemicznej.

Słowa kluczowe: *Clostridium perfringens*, fala elektromagnetyczna, osad czynny nadmierny, materia organiczna.

WSTĘP

Osady ściekowe ze względu na dużą zawartość materii organicznej, makro- i mikroskładników niosą ze sobą bardzo duży potencjał nawozowy i coraz częściej są wykorzystywane w nawożeniu terenów rolniczych i leśnych oraz rekultywacji terenów zielonych [8]. Jak podaje Szwedziak [18] osady wprowadzane do wierzchnich warstw gleby są źródłem wielu składników pokarmowych dla roślin, wpływają na procesy glebotwórcze i przyczyniają się do wzmożonej aktywności biologicznej gleby. Istnieją jednak ograniczenia w stosowaniu osadów ściekowych w celu użyźniania gleby w odniesieniu do ich stanu sanitarnego, który niejednokrotnie uniemożliwia ich dalszą eksploatację i wykorzystanie. Jest to kluczowy problem bowiem obecność mikroorganizmów chorobotwórczych z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz gatunku *Clostridium perfringens* jest jednym z decydujących czynników, jakie należy brać pod uwagę w przypadku dalszej procedury postępowania z tego rodzaju odpadem [4].

¹ Akademia Techniczno-Humanistyczna, Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska, 43-300 Bielsko-Biała, ul. Willowa 2

² Śląskie Środowiskowe Studium Doktoranckie PAN, 40-166 Katowice, Pl. Gwarków 1

Clostridium perfringens jest Gram-dodatnią, ściśle beztlenową, przetrwalnikującą laseczką, często postrzeganą jako patogen wywołujący wiele schorzeń u ludzi i zwierząt [16, 20]. Człowiek jest głównym rezerwuarem szczepów *C. perfringens* trafiających do wody, gleby, ścieków, a później osadów ściekowych [2, 3, 7, 11, 12, 16, 17]. Zdolność *C. perfringens* do przeżywania w różnych środowiskach związana jest z wytwarzaniem przetrwalników, bakteriocyn oraz licznych enzymów takich jak: dysmutaza nadtlenkowa, reduktaza siarczkowa, peroksydaza, a także deaminaza argininowa, które odgrywają istotną rolę w adaptacji do kwaśnego środowiska bytowania oraz przekształcają argininę do amoniaku.

Obecność tego patogenu w osadach ściekowych może stwarzać zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt [1, 6, 10, 14]. Odpowiedni sposób przeróbki i utylizacji osadów ściekowych może się przyczynić do ograniczenia występowania w nich patogenów lub całkowitej ich eliminacji [19].

Jedną z metod dezintegracji jest wykorzystanie promieniowania mikrofalowego. Promieniowania mikrofalowe to rodzaj promieniowania elektromagnetycznego o długości fali zawierającej się w granicach od 1 m do około 1 mm; spektrum fali zawarte jest w przedziale pomiędzy podczerwienią i falami ultrakrótkimi, co oznacza zakres 3×10^{-4} m do 3×10^{-1} m, częstotliwość $= 3 \cdot 10^9 - 3 \cdot 10^{12}$ Hz, a długości $\lambda = 10^{-4} - 10^{-1}$ m.

Promieniowanie mikrofalowe rozchodzi się w postaci wzajemnie przenikających się drgań elektrycznych i magnetycznych, które generują ruch cząsteczek w zmiennym polu elektrycznym bez naruszania trwałości wiązań chemicznych w nich istniejących.

Osady ściekowe w swej masie zawierają ponad 70% wody, dzięki czemu mikrofauna może znacznie wpływać na ich cechy i strukturę. Liczne bakterie, pierwotniaki, drożdże, grzyby oraz jaja pasożytów występujące w osadzie czynnym pod wpływem pola magnetycznego ulegają destrukcji [9]. Do podstawowych mechanizmów oddziaływania pola elektromagnetycznego na mikroorganizmy należą: deformacja, depolaryzacja (przebiegunowanie elektryczne komórki), perforacja ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej, co może prowadzić do zmian stanu uwodnienia komórki, transportu komórkowego i jej obumarcia.

Celem pracy było dokonanie oceny skuteczności procesu higienizacji z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego na podstawie analizy porównawczej stanu mikrobiologicznego osadu ściekowego.

METODYKA BADAŃ

Materiałem do badań był osad czynny nadmierny pobierany z oczyszczalni ścieków położonej na terenie województwa śląskiego. Natężenie dopływu ścieków w tej oczyszczalni było na poziomie $90\ 000\ \text{m}^3/\text{d}$, czas zatrzymania ścieków ok 14 dni, stężenie suchej masy w bioreaktorze na poziomie $4320\text{--}4640\ \text{mg/l}$. Wykorzystuje ona zintegrowany system usuwania ze ścieków związków organicznych oraz azotu i fosforu metodą osadu czynnego.

W pobranym materiale oznaczono wartość ChZT jako wyznacznik materii organicznej w oparciu o metodykę zawartą w *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* [5].

Badania mikroskopowe prowadzono wykorzystując mikroskop Nikon Alphaphot – 2 YS jasnego pola i kontrastowo – fazowy sprzężony z kamerą Panasonic GP – KR 222. Uzyskane wyniki mikroskopowe analizowano stosując program obróbki komputerowej obrazu *Lucia* – ScMeas Version 4.51.

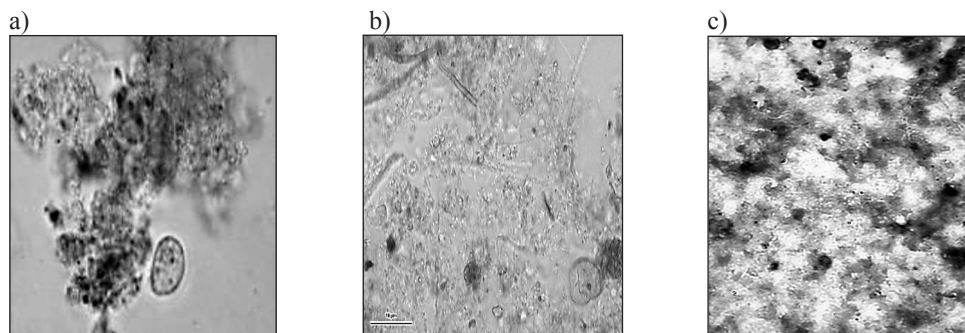
Badania mikrobiologiczne obejmowały oznaczenia: ogólnej liczby bakterii w osadzie nadmiernym, liczebność mikroorganizmów z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz gatunku *Clostridium perfringens*. Liczebność jednostek tworzących kolonie (jtk) bakterii w próbkach osadu nadmiernego oznaczano metodą płytek tartych na podłożach wybiórczych: Agar z krwią, Mac Conkey. Oznaczenie liczby bakterii w osadzie nadmiernym dokonano wg Polskiej Normy PN-EN ISO 6222:2004. Bakterie z rodzaju *Clostridium perfringens* oznaczano na selektywnym podłożu SPS, inkubując hodowle w temperaturze 44 °C przez 24 h, po dokonaniu szoku termicznego w temperaturze 80 °C w czasie 10 min [15].

Higienizację osadu prowadzono z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego o mocy 700 W i 900 W w czasie 60 s i 120 s. Krótkie czasy dezintegracji mikrofalowej spowodowane były zapobieżeniem (uniknięciem) zajścia pasteryzacji osadu.

Przedstawione wyniki analizy chemicznej i mikrobiologicznej dotyczą średniej uzyskanej z 10 powtórzeń.

WYNIKI I DYSKUSJA

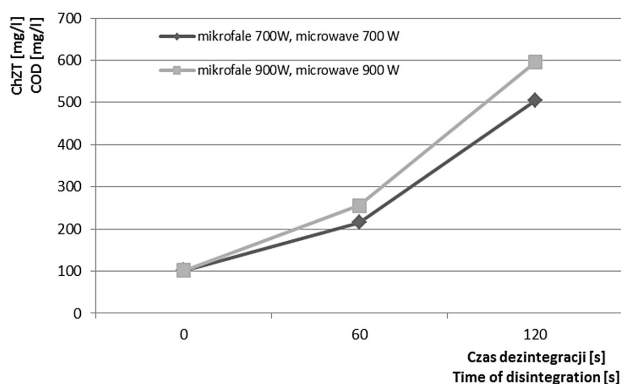
Celem badań było wykazanie możliwości wykorzystania dezintegracji mikrofalowej o mocy 700W i 900W do higienizacji osadu czynnego nadmiernego. Jak wynika z obserwacji mikroskopowych proces ten doprowadził do destrukcji struktury kłaczków osadu czynnego nadmiernego (fot .1).



Fot. 1. Obraz mikroskopowy osadu: a) osad przed procesem dezintegracji, b) i c) osad po mikrofalowej dezintegracji odpowiednio dla 700 W i 900 W.

Fot. 1. Microscopic observation of activated sludge: a) before disintegration process, b) and c) after microwave disintegration for 700 W and 900 W, respectively.

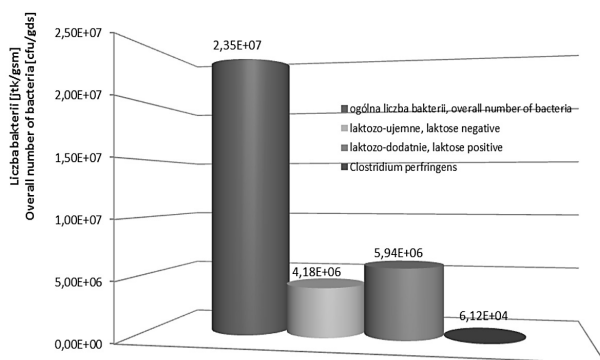
Potwierdzeniem zmian fizycznych w osadzie nadmiernym pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego były wyniki wartości ChZT w cieczy nadosadowej. Ich wzrost świadczył o destrukcyjnym działaniu promieniowania na kłaczki osadu i mikroorganizmy, powodując uwolnienie materii organicznej. O wartości uwolnionego ChZT decydowała moc promieniowania mikrofalowego oraz czas działania (rys. 1).



Rys. 1. Zmiana wartości ChZT w cieczy nadosadowej pod wpływem promieniowania mikrofalowego (700 W i 900 W)

Fig. 1. Changes of COD in supernatant of activated sludge after microwave disintegration (700 W and 900 W)

Przeprowadzone analizy mikrobiologiczne ujawniły skażenie osadu nadmiernego patogenami (rys. 2). W 1 gramie suchej masy osadu stwierdzono ogólną liczbę bakterii wynoszącą 23 500 000 jtk. W tej liczbie oznaczono: 4 180 000 komórek pałeczek laktozo-ujemnych (laktozo⁻), 5 940 000 pałeczek laktozo-dodatnich (laktozo⁺) oraz 61 200 komórek *Clostridium perfringens*.



Rys. 2. Liczba bakterii w osadzie nadmiernym przed procesem higienizacji

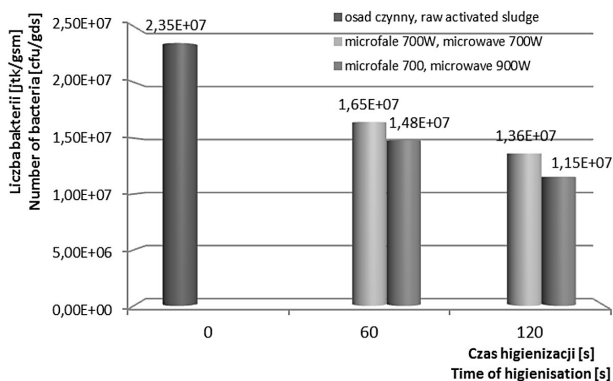
Fig. 2. Number of bacteria in activated sludge before hygienization process

Poddanie osadu nadmiernego działaniu energii elektromagnetycznej spowodowało zmniejszenie ogólnej liczby bakterii, *Clostridium perfringens* oraz pałeczek laktozo⁺+, i laktozo⁻-, (rys. 3–5).

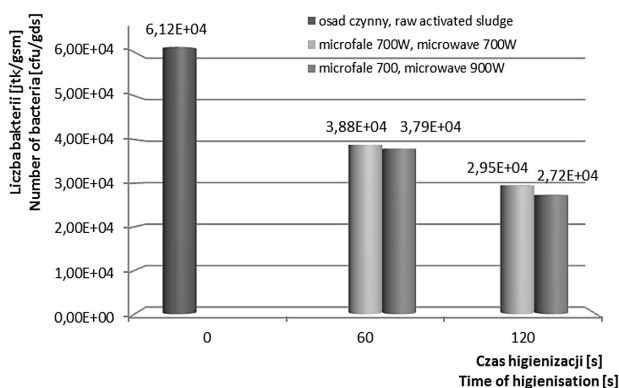
Promieniowanie elektromagnetyczne o mocy 700W w czasie 120s spowodowało redukcję ogólnej liczby bakterii o 42%. Natomiast zwiększenie mocy promieniowania mikrofalowego do 900W przyczyniło się do dalszej redukcji ogólnej liczby bakterii o 9%.

Higienizacja osadu przy pomocy mikrofal (700W i 900W) spowodowała spadek liczebności *Clostridium perfringens* odpowiednio o 36,5% i 38,0% w czasie 60s oddziaływania (rys. 4). Wydłużenie czasu do 120s przyczyniło się do dalszej redukcji wynoszącej 51,8% dla mocy 700W i 55,5% dla mocy 900W promieniowania (rys. 4).

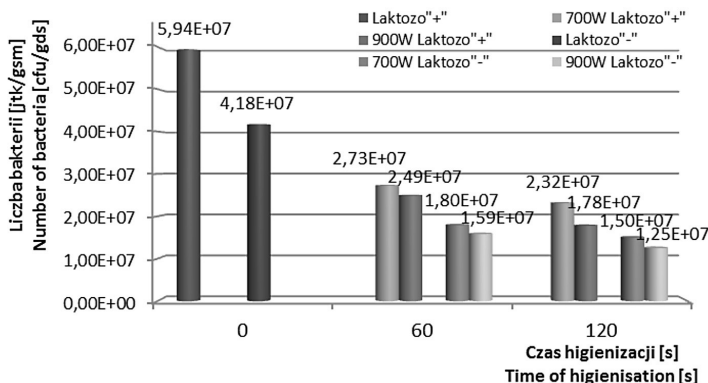
Higienizacja mikrofalowa osadu nadmiernego była skuteczna również w odniesieniu do pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (rys. 5).



Rys. 3. Wpływ higienizacji mikrofalowej na ogólną liczbę bakterii
 Fig. 3. Changes of overall number of bacteria after microwave hygienization



Rys. 4. Zmiana liczby *Clostridium perfringens* pod wpływem higienizacji mikrofalowej
 Fig. 4. Changes of number of *Clostridium perfringens* after microwave hygienization



Rys. 5. Zmiana liczebności laktazo”+, i laktazo”-, pod wpływem higienizacji mikrofalowej
Fig. 5. Changes of lactose positive and lactose negative bacteria number after microwave hygienization

Liczba bakterii laktozoujemnych w 1 g suchej masy osadu uległa redukcji o ok. 64% i 70% przy zastosowaniu dezintegracji mikrofalowej o mocy odpowiednio 700 W i 900 W i czasu 120 s.

WNIOSKI

1. Promieniowanie mikrofalowe wpływa destrukcyjnie na osad czynny nadmierny powodując jego destrukcję oraz uwolnienie materii organicznej wyrażonej wartością ChZT. Dezintegracja z wykorzystaniem mocy fali elektromagnetycznej 700 W spowodowała ok. 5-krotny wzrost wartości ChZT, natomiast o mocy 900 W – 6-krotny w czasie 120 s.
2. Analizy mikrobiologiczne wykazały higienizujące działanie fali elektromagnetycznej. Promieniowanie mikrofalowe (700 W i 900 W) spowodowało spadek liczebności *Clostridium perfringens* odpowiednio o 51,8% i 55,5% w czasie 120 s oddziaływania.
3. Redukcja ogólnej liczby bakterii pod wpływem mikrofal wyniosła 42% i 51% (odpowiednio dla 700 W i 900 W) w czasie 120 s działania mikrofal.
4. Liczba pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* uległa redukcji od 54% do 70% w zależności od mocy promieniowania, czasu działania i własności biochemicznych bakterii.

Acknowledgements

This work was supported by the EU ROUTES project (Contract No 265156, FP7 2007-2013, THEME [ENV.2010.3.1.1-2] Innovative system solutions for municipal sludge treatment and management)

PIŚMIENNICTWO

1. Budzińska K., Berleć K., Rzepczyk B., Michalska M., Szejniuk B. 2001. Analiza zachowania się bakterii wskaźnikowych w osadach pochodzących z oczyszczalni ścieków. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 477: 301-306.
2. Carman R.J., Sayeed S., Li J., Genheimer Ch.W., Hiltonsmith M.F., Wilkins T.D., McClane B.A. 2008. *Clostridium perfringens* toxin genotypes in the feces of healthy North Americans. *Anaerobe*, 14, 102–108.
3. Deguchi A., Miyamoto K., Kuwahara T., Miki Y., Kaneko I., Li J., McClane B. A., Aki moto S. 2009. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PloS One*, 4: e5598.
4. Dudley D. J., Guentzel M. N., Ibarra M. J., Moore B. E., Sagik B. P. 1980. Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. *Applied Environmental Microbiology*, 39, 1: 118–126.
5. Eaton A. 1995. *Standard Methods For The Examination Of Water & Wastewater*. American Society for Testing Materials.
6. Harrison B., Raju D., Garmory H.S., Brett M.M., Titball R.W., Sarker M.R. 2005. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin-encoding gene. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 8362–8370.
7. Heikinheimo A., Lindström M., Granum P.E., Korkeala H. 2006. Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerging Infectious Diseases*, 12: 1727–1758.
8. Kaniuczak J., Hajduk E., Zzmorska J., Ilek M. 2009. Charakterystyka osadów ściekowych pod względem przydatności do przyrodniczego wykorzystania. *Zeszyty Naukowe PTIE i PTG Oddział Rzeszów*, 11: 89-94.
9. Kennedy K.J., Thibault G., Droste R.L. 2007. *Microwave enhanced digestion of aerobic SBR sludge*. *Water SA*, 33: 261-270.
10. Kłapeć T., Stoczyńska-Sikorska M., Galińska E. 1999. Wybrane zagadnienia dotyczące skażeń biologicznych osadów ściekowych przeznaczonych do rolniczego wykorzystania. *Medycyna Środowiskowa*, 2, 1: 23-30.
11. Li J., Sayeed S., McClane B.A. 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 7218–7224.
12. Nakamura M., Kato A., Tanaka D., Gyobu Y., Higaki S., Karasawa T., Yamagishi T. 2004. PCR identification of the plasmid-borne enterotoxin gene (*cpe*) in *Clostridium perfringens* strains isolated from food poisoning outbreaks. *International Journal of Medical Microbiology*, 294: 261–265.
13. PN-EN ISO 6222:2004
14. Poxton I.R. 2006. Other *Clostridium* spp. [w:] *Principles and practice of clinical bacteriology*. Ed. S.H. Gillespie, P.M. Hawkey, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex: 567–574.
15. 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* in sludge, soils and organic fertilizers: Pour plate method for quantification, University of Barcelona.

16. Sirous M., Namaki S., Mirshafiey A. 2009. Clostridia. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, 4: 35–47.
17. Sobel J., Mixter Ch.G., Kolhe P., Gupta A., Guarner J., Zaki S., HoQman N., Songer J.G., Fremont-Smith M., Fischer M., Killgore G., Britz P.H., MacDonald C. 2005. Necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* type A in previously healthy North American adults. *Journal of The American College of Surgeons*, 201: 48–56.
18. Szwedziak K. 2006. Charakterystyka osadów ściekowych i rolnicze wykorzystanie. *Inżynieria Rolnicza*, 4: 297-302.
19. Środa K., Kijo-Kleczkowska A., Otwinowski H. 2012. Termiczne unieszkodliwianie osadów ściekowych. *Inżynieria Ekologiczna*, 28: 67-81.
20. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y., Park Y.H. 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 228–232.

ELIMINATION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* DURING SURPLUS ACTIVATED SLUDGE HANDLING

Summary

The work presents the possibility of elimination of *Clostridium perfringens* in surplus activated sludge handling by microwave radiation. An assessment of the impact of microwave radiation as a disintegration and higienisation method of surplus activated sludge was based on an analysis of the value of COD and changes in population of the bacteria *Clostridium perfringens* and overall sticks in the family *Enterobacteriaceae*.

Basis on the results of the research was concluded that microwave radiation (700W and 900W) shows disintegration action expressed in COD value in the supernatant increase: 12 times increase value of COD with power 700W and 13 times for 900W radiation power. Electromagnetic wave contributed to partial higienisation of surplus activated sludge. The number of *Clostridium perfringens* decrease about 52% and 56% during the 120s of higienisation process with power 700W and 900W, respectively. Reduction of the overall number of bacteria under the influence of microwave radiation was 42% and 51% (respectively for 700W and 900W), and sticks from the family *Enterobacteriaceae* from 54% to 70% depending on the power of radiation, the time of operation and biochemical properties.

Keywords: *Clostridium perfringens*, electromagnetic wave, surplus activated sludge, organic matter