



Politechnika Śląska

Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki

Katedra Biotechnologii Środowiskowej

POSZERZONE STRESZCZENIE

Poprawa hydrolizy osadów ściekowych w celu intensyfikacji fermentacji metanowej

mgr inż. Magdalena Ćwiertniewicz-Wojciechowska

Promotor: prof. dr hab. Aleksandra Ziemińska-Buczyńska

Promotor pomocniczy: dr inż. Grzegorz Cema

Dyscyplina: Inżynieria środowiska, Górnictwo i Energetyka

GLIWICE 2026

1. Zakres prowadzonych badań

Zakres prowadzonych badań obejmował izolację, charakterystykę i identyfikację mikroorganizmów celulolitycznych, bytujących w osadzie ściekowym. Osad ściekowy służący do izolacji mikroorganizmów, poddawany był obróbce z wykorzystaniem wyizolowanych wcześniej mikroorganizmów, celem oceny takiego rodzaju biologicznej metody hydrolizy jako metody intensyfikacji rozkładu materii organicznej, ze szczególnym uwzględnieniem celulozy, oraz intensyfikacji fermentacji metanowej.

2. Cel badań

Celem prowadzonych badań była weryfikacja możliwości wykorzystania autochtonicznych bakterii i grzybów celulolitycznych do intensyfikacji produkcji biogazu na skutek biologicznej hydrolizy materii organicznej badanych osadów, a w szczególności celulozy. Badania miały na celu ocenę zastosowania mikroorganizmów już obecnych w osadzie ściekowym oczyszczalni jako sposobu na nisko kosztowe i przyjazne środowisku wsparcie hydrolizy trudno rozkładalnych substancji organicznych i wynikającą z tego intensyfikację produkcji biometanu.

3. Hipoteza badawcza

Postawiona hipoteza badawcza zakłada, że zwiększenie ilości mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie ściekowym, wpłynie pozytywnie na rozkład materii organicznej i produkcję biogazu. Mikroorganizmy obecne w danym środowisku posiadają zdolności do funkcjonowania i namnażania, na skutek efektywnego wykorzystania dostępnej materii jako źródło pożywienia. Nadmierna ilość celulozy w suchej masie przefermentowanych osadów wskazuje na nieefektywne wykorzystanie tego polimeru przez mikroorganizmy. W związku z tym, wprowadzenie do osadu wcześniej wyizolowanych z tego środowiska mikroorganizmów może wpłynąć pozytywnie na efektywniejszą degradację celulozy, zmniejszając ilość suchej masy organicznej w przefermentowanych osadach, zwiększając ilość produkowanego metanu poprzez poprawę rozkładu złożonych substancji organicznych oraz zmniejszyć ilość przefermentowanych osadów ściekowych w ogóle.

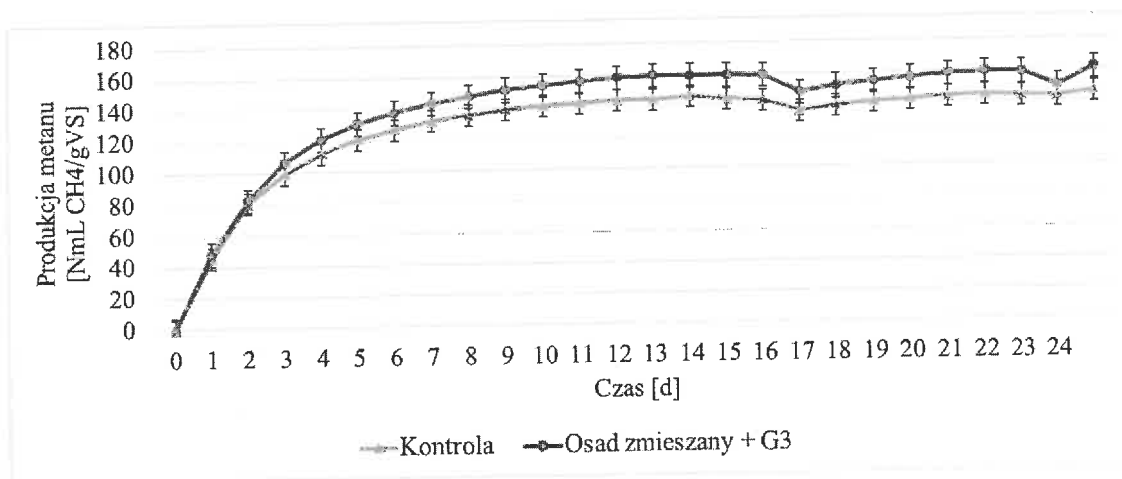
4. Opis przedmiotu badań

Obiekt badawczy stanowiły osady ściekowe pobierane z Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Gliwicach. Do badań wykorzystywane były osady zmieszane, trafiające do komory fermentacyjnej oraz osad już fermentowany w Wydzielonej Komorze Fermentacyjnej (WKF).

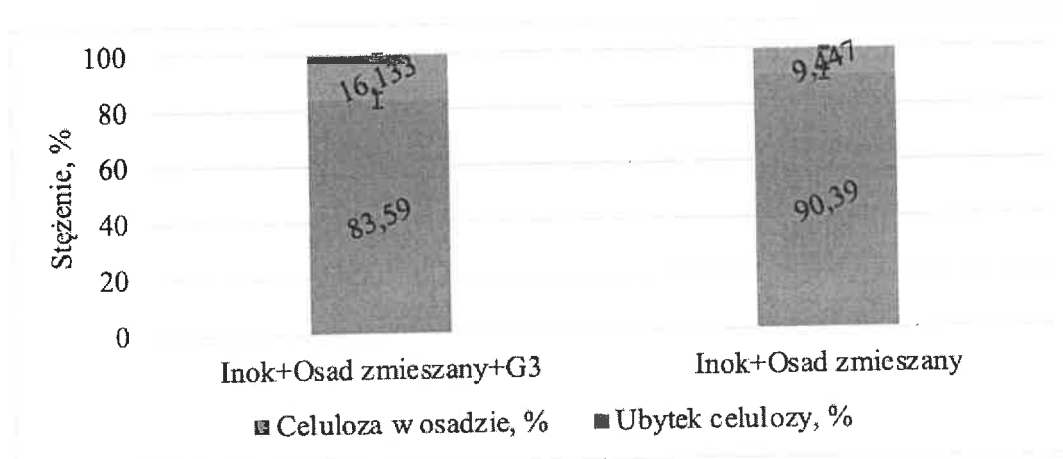
Mikroorganizmy celulolityczne izolowane były z osadów pobieranych z WKF jako środowiska, w którym mikroorganizmy te powinny występować, oraz być zdolne do efektywnej degradacji z celulozy w zadanych warunkach. Efektywność degradacji celulozy przez wyizolowane mikroorganizmy i produkowane przez nie enzymy była weryfikowana z wykorzystaniem osadów ściekowych trafiających do WKF.

5. Główne wyniki i wnioski

Prowadzone badania zakładały weryfikację możliwości wykorzystania mikroorganizmów celulolitycznych bytujących w osadzie ściekowym, a więc grzybów i bakterii. Ocenę wpływu biologicznej hydrolizy osadów ściekowych z wykorzystaniem grzybów opisano w **Publikacji 2**. Podczas prowadzonych badań wyizolowanych zostało 12 szczepów celulolitycznych grzybów mikroskopijnych. 5 z nich zdolnych było do wzrostu i degradacji celulozy w warunkach beztlenowych i tlenowych. Wszystkie z nich należały do rodzaju *Aspergillus*. Wyizolowane grzyby testowane były pod kątem efektywnej degradacji celulozy czystej, na tej podstawie wybrany został jeden szczep do oceny degradacji celulozy w osadzie ściekowym i intensyfikacji produkcji metanu. Na rysunku 1 przedstawiono przebieg produkcji metanu z wykorzystaniem badanego szczepu, grzyba *Aspergillus terreus* S011, oznaczanego jako G3. Zaszczepienie osadu ściekowego grzybem *Aspergillus terreus* S011- G3 wpłynęło na intensyfikację produkcji biometanu o 11% w porównaniu z osadem niepoddanym obróbce. Na rysunku 2 przedstawiono stopień degradacji celulozy w osadzie po dodaniu grzyba G3 oraz bez obróbki.



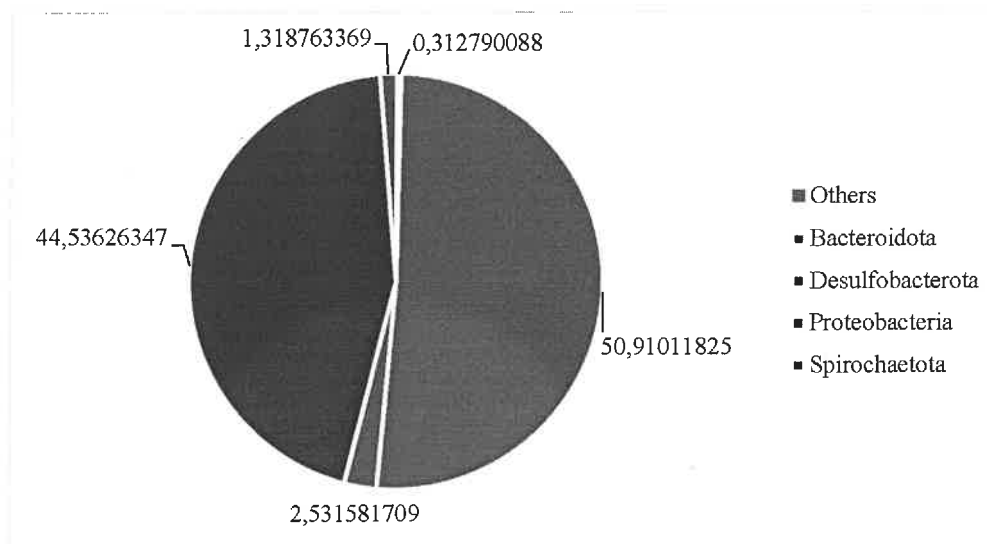
Rys. 1 Porównanie produkcji biometanu dla osadu zaszczepionego grzybem G3-*Aspergillus terreus* i osadu niepoddanego obróbce.



Rys. 2 Procentowy ubytek celulozy na skutek zaszczepienia osadu ściekowego grzybem G3- *Aspergillus terreus* S011.

Efektywność degradacji celulozy w osadzie ściekowym wyniosła 6,7%.

Izolacja czystych szczepów bakterii celulolitycznych była znacznie trudniejsza, w porównaniu z izolacją celulolitycznych grzybów. Początkowo izolacja prowadzona była z wykorzystaniem wybiórczego podłoża, w którym jedynym źródłem węgla była karboksymetyloceluloza sodowa. Wskaźnikiem degradacji celulozy na podłożu był barwnik Czerwień Kongo. Każdorazowa próba izolacji czystego szczepu, od posiewu do wzrostu trwała około miesiąc lub nie obserwowano wzrostu. Pasażowanie bakterii na nowe podłoże stałe prowadziło do utraty zdolności do rozkładu celulozy w postaci karboksymetylocelulozy sodowej na podłożu stałym. W **Publikacji 4** opisana została ponowna próba izolacji autochtonicznych bakterii celulolitycznych. Została ona przeprowadzona z wykorzystaniem płynnego medium, w którym źródłem celulozy ponownie była karboksymetyloceluloza sodowa. Wielokrotny pasaż w płynnym środowisku, pozwolił na izolację mieszanej hodowli bakterii celulolitycznych. Niemożliwa była jednak izolacja pojedynczej kultury na podłożu stałym, ze względu na ponownie obserwowaną utratę właściwości celulolitycznych. Mieszana hodowla bakterii, funkcjonująca w podłożu płynnym, w którym jedynym źródłem węgla była karboksymetyloceluloza sodowa została zidentyfikowana za pomocą Sekwencjonowania Następnej Generacji (ang. Next-Generation Sequencing, NGS). Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, że w mieszaninie znajdują się bakterie scharakteryzowane jako celulolityczne, jak również wiele innych, zdolnych do rozkładu innych substancji organicznych. Skład mieszanej hodowli bakterii przedstawiono na rysunku 3. Sekwencje, które stanowiły mniej niż 1% społeczności, zostały zgrupowane w kategorii „Others”.



Rys. 3 Sekwencje, które stanowiły mniej niż 1% społeczności, zostały zgrupowane w kategorii „Others”.

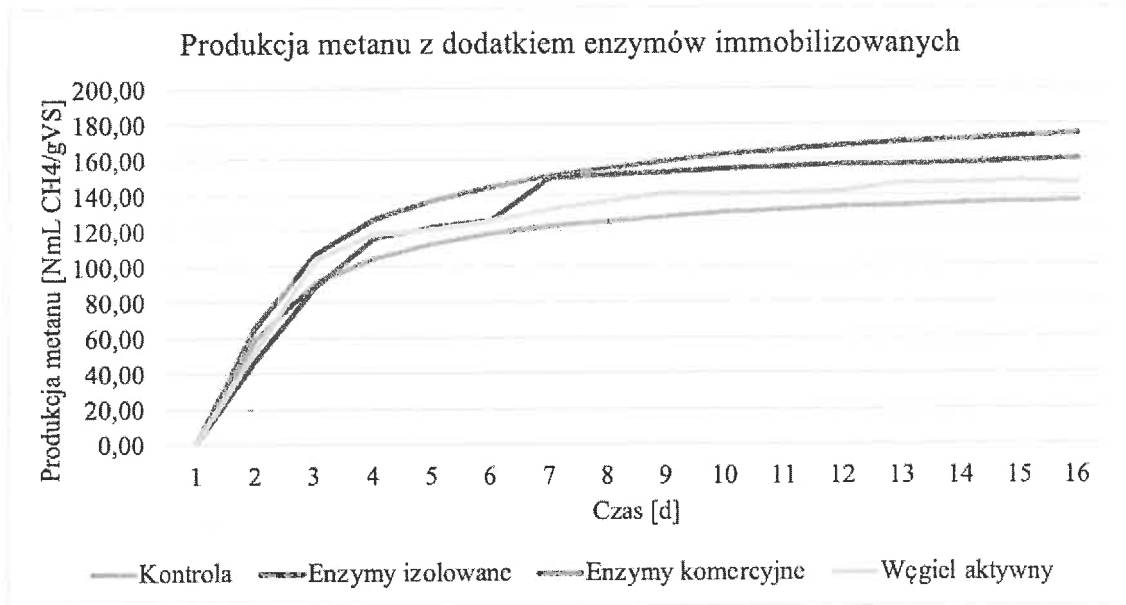
Bakterie obecne w mieszanej kulturze wykazują pewne podobieństwa, np. wykorzystują do swoich procesów węglowodany lub efektywnie przekształcają kwasy tłuszczowe. W mieszanej hodowli podobne właściwości posiadają bakterie występujące obficie w osadzie, jak i przedstawiciele najmniej licznych grup. Ponieważ bakterie o mniejszej liczebności mają podobne zdolności do bakterii o większej liczebności, ich obecność w mieszaninie do izolacji enzymów sugeruje, że nadal istnieje możliwość ich wzrostu i posiadania pewnych składników odżywczych. Ponadto większość zidentyfikowanych mikroorganizmów nie jest ściśle celulolityczna, ale beztlenowa i zdolna do rozkładu różnych związków organicznych. To wskazuje, że ich obecność w mieszanej kulturze i wytwarzane przez nie enzymy mogą wspomagać proces hydrolizy poprzez rozkład różnych związków organicznych.

Te wyniki pozwoliły na wysunięcie wniosku, że badane autochtoniczne bakterie celulolityczne nie są w stanie efektywnie samodzielnie degradować celulozy, a mogą robić to jedynie w konsorcjum, wspierane przez inne bakterie. Dlatego, kolejne kroki realizowane były z wykorzystaniem mieszanej hodowli bakterii.

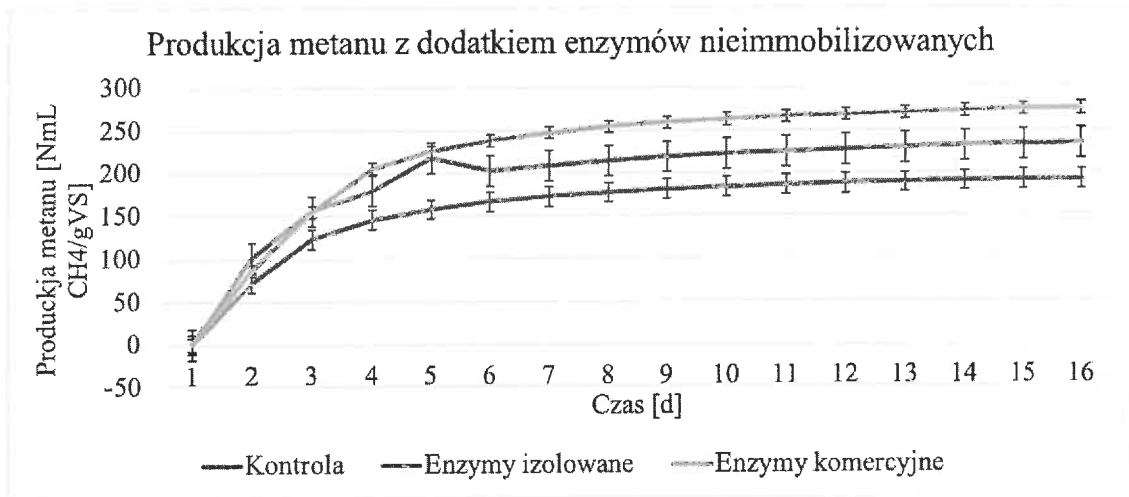
Zarówno grzyby, jak i mieszaną hodowlę bakterii testowano pod kątem możliwości przechowywania. Mikroorganizmy były mrożone i liofilizowane. Zaobserwowano, że możliwe jest przechowywanie zamrożonych i liofilizowanych grzybów, jednak te same procedury powodowały utratę właściwości celulolitycznych bakterii. W związku z tym, do kolejnych badań wykorzystane zostały enzymy wyizolowane z mieszanej

hodowli autochtonicznych bakterii celulolitycznych. Izolowane enzymy badane były w odniesieniu do komercyjnej mieszanki enzymów celulolitycznych. Dla badanych enzymów przeprowadzona została również immobilizacja, z wykorzystaniem węgla aktywnego jako nośnika (**Publikacja 3, 4, 5**). Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno wykorzystanie wyizolowanych grzybów celulolitycznych, jak i izolowanych enzymów wpływa na intensyfikację produkcji metanu. Oceniono również brak utraty efektywności działania izolowanych enzymów immobilizowanych i nieimmobilizowanych po roku przechowywania w temperaturze 4°C.

Mimo łatwiejszej izolacji i przechowywania autochtonicznych grzybów celulolitycznych, szczegółowe badania przeprowadzone z wykorzystaniem bakterii i izolowanych przez nie enzymów. Główną przyczyną była możliwość zastosowania tego rozwiązania w przemyśle, jak i mniejsze zagrożenie dla człowieka, jakie niesie za sobą praca z grzybami mikroskopijnymi, zarówno w laboratorium, jak i w skali przemysłowej. W związku z tym, w osadzie poddanym enzymatycznej obróbce z wykorzystaniem izolowanych i komercyjnych, immobilizowanych i nieimmobilizowanych enzymów weryfikowane były również zmiany w parametrach fizykochemicznych, takich jak stężenie azotu ogólnego, azotu amonowego, lotnych kwasów tłuszczowych i chemicznego zapotrzebowania na tlen. Podobnie jak w przypadku badań prowadzonych dla grzybów, weryfikowana była również degradacja celulozy i produkcja metanu. Na rysunku 4 i 5 przedstawiony został przebieg produkcji metanu, natomiast tabela 1 przedstawia procentową degradację celulozy w badanym osadzie ściekowym, podczas testu produkcji biogazu.



Rys. 4 Wpływ biologicznej obróbki osadów ściekowych, z wykorzystaniem enzymów immobilizowanych na węglu aktywnym.



Rys. 5 Wpływ biologicznej obróbki osadów ściekowych z wykorzystaniem enzymów nieimmobilizowanych.

Zaszczepienie osadu ściekowego enzymami immobilizowanymi i nieimmobilizowanymi, zarówno komercyjnymi jak i izolowanymi wpłynęło na intensyfikację produkcji biometanu. Zarówno w przypadku enzymów immobilizowanych jak i nieimmobilizowanych najwyższą produkcję biometanu uzyskano z osadu z dodatkiem enzymów komercyjnych. Wzrost potencjału metanowego po 15 dniach testu wynosił: 18,9% dla enzymów izolowanych

immobilizowanych oraz 27% dla enzymów komercyjnych immobilizowanych. W przypadku zastosowania samego węgla aktywnego, również wykorzystywanego w badaniach do intensyfikacji produkcji biogazu, procent wzrostu potencjału metanowego wyniósł 6,75%. Dla osadów poddawanych działaniu enzymów nieimmobilizowanych, wzrost potencjału metanowego wyniósł 21,7% dla enzymów izolowanych, a 43% dla enzymów komercyjnych.

Oceniony został również wpływ obecności enzymów izolowanych i komercyjnych, immobilizowanych i nieimmobilizowanych na skład konsorcjum mikroorganizmów osadu ściekowego. Analiza wykazała brak znaczących zmian w składzie konsorcjum w badanym czasie.

Tab. 1 Stężenie celulozy określone przed i po teście potencjału metanowego (AMPTS) dla inokulum (osadu pobranego z komory fermentacyjnej) oraz mieszanki zagęszczonego osadu wstępnego i osadu nadmiernego, poddanego działaniu enzymów immobilizowanych i nieimmobilizowanych: izolowanych i komercyjnych. I – inokulum, I0 – w czasie „0”, INE – po AMPTS, SS – osad zmieszany, IE – enzymy izolowane, CE – enzymy komercyjne, carb – węgiel aktywny.

Typ badanego materiału	Stężenie celulozy (% TS)	
	Enzymy immobilizowane	Enzymy nieimmobilizowane
I0	31.20±3.63	30.52±0.81
INE	28.28±1.84	28.61±0.33
I+SS	29.93±0.69	27.53±1.94
I+SS+IE	28.09±1.92	22.58±0.75
I+SS+CE	28.87±0.96	27.98±0.79
I+carb	27.88±1.0	-
I+IE	28.17±3.38	29.64±2.63
I+CE	11.21±0.37	28.56±0.88

Poniżej wypunktowane zostały główne wnioski, wysunięte w trakcie i po zakończeniu badań w ramach prowadzonych prac:

- możliwe jest wyizolowanie pojedynczych szczepów celulolitycznych z osadu ściekowego, jednak ich przechowywanie, poprzez mrożenie, liofilizację i pasaż prowadzi do utraty właściwości celulolitycznych lub wydłużenia czasu wzrostu.

- Niektóre szczepy celulolityczne tracą również właściwości po odseparowaniu ich od innych bakterii, z którymi wzrastały na podłożu stałym. Izolacja autochtonicznych bakterii w podłożu płynnym z dodatkiem karboksymetylocelulozy, wykazała obecność celulolitycznych bakterii, jak również innych szczepów, które swoją obecnością w mieszanej hodowli, najpewniej wspierały wzajemnie swoje działania.

- Enzymatyczna obróbka osadów ściekowych, z wykorzystaniem mieszaniny enzymów izolowanych z mieszanej hodowli bakterii zdolnych do degradacji celulozy wpływa na intensyfikację produkcji metanu, celulozy i poprawę hydrolizy osadów ściekowych, prowadząc do możliwości skrócenia czasu potrzebnego na fermentację.

- Wykorzystanie grzybów mikroskopijnych w postaci strzępek, jako biologicznej metody obróbki osadów ściekowych wpływa na intensyfikację degradacji celulozy i potencjału metanowego tych osadów.

- Immobilizacja enzymów stabilizuje ich działanie poprzez wydłużenie działania enzymów izolowanych i zmniejszenie intensywności działania w przypadku enzymów komercyjnych, zabezpieczając proces przed nadmiernym zakwaszaniem, na skutek zwiększonej produkcji LKT.

- Zastosowanie enzymatycznej obróbki osadów ściekowych z wykorzystaniem enzymów izolowanych i komercyjnych, w formie immobilizowanej i nieimmobilizowanej w objętości 1% suchej masy substratu, nie wpływa w znaczącym stopniu na skład zbiorowiska bakterii zasiedlających badany osad ściekowy.

6. Podsumowanie wkładu własnego

Wkład własny w pracy doktorskiej obejmuje izolację, charakterystykę i przygotowanie wyizolowanych mikroorganizmów do identyfikacji. Badania weryfikujące efekt hydrolizy osadów ściekowych po zastosowaniu biologicznej obróbki z wykorzystaniem grzyba

Aspergillus terreus- G3, oraz immobilizowanych i nieimmobilizowanych enzymów izolowanych i komercyjnych również realizowany był samodzielnie. Analiza wszelkich uzyskanych wyników i ich opracowanie stanowiła wkład własny. Współpraca z promotorami stanowiła ważny element pracy nad rozprawą, umożliwiając efektywne prowadzenie badań i planowanie kolejnych kroków bez znaczących opóźnień. Do działań, które realizowane były przy współpracy, lub jako zlecenie należą: sekwencjonowanie wyizolowanych mikroorganizmów oraz immobilizacja enzymów i analiza termogravimetryczna TGA.