



Politechnika Śląska

Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki

Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Streszczenie w języku polskim

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

Oczyszczanie ścieków stanowi złożony proces technologiczny, którego celem jest usuwanie zanieczyszczeń fizycznych, chemicznych oraz biologicznych ze ścieków. Skuteczna realizacja tego procesu umożliwi bezpieczne odprowadzanie ścieków oczyszczonych do odbiorników wodnych lub do środowiska gruntowego, zgodnie z obowiązującymi wymaganiami legislacyjnymi.

W trakcie oczyszczania, obok ścieków oczyszczonych, powstają osady ściekowe, które ze względu na swój skład oraz ilość wymagają odpowiedniego ustabilizowania i racjonalnego zagospodarowania. Procesy związane z ich przetwarzaniem, obejmujące m.in. odwadnianie, higienizację, transport oraz unieszkodliwianie, generują istotne koszty eksploatacyjne dla oczyszczalni ścieków.

Ustabilizowane osady ściekowe mogą być wykorzystywane w różnych celach, takich jak nawożenie roślin nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi i zwierzęta, rekultywacja terenów zdegradowanych, kompostowanie, bądź składowanie. Do ich stabilizacji stosuje się metody biologiczne, chemiczne oraz termiczne, przy czym najczęściej wykorzystywane są metody biologiczne, w szczególności fermentacja metanowa. Należy jednak podkreślić, że efektywność fermentacji beztlenowej nie zawsze gwarantuje uzyskanie parametrów osadu zgodnych z wymaganiami określonymi w Obwieszczeniu Ministra Klimatu i Środowiska z dnia 18 listopada 2022 r.

W związku z powyższym coraz częściej stosuje się wstępną obróbkę osadów ściekowych przed procesem fermentacji. Zabieg ten intensyfikuje przebieg hydrolizy oraz całego procesu fermentacji, przyczyniając się do zwiększenia efektywności stabilizacji, poprawy jakości i ilości uzyskiwanego pofermentu, a także wpływa na wydajność i skład produkowanego biogazu.

Na efektywność stabilizacji osadów ściekowych istotny wpływ ma ich skład, w szczególności zawartość trudno biodegradowalnych substancji organicznych. Do tej grupy należy m.in. celuloza, czyli polisacharyd stanowiący podstawowy element strukturalny ścian komórkowych roślin, a zarazem jeden z najpowszechniej występujących polimerów w środowisku. Celuloza stanowi również istotny składnik materii organicznej dopływającej do systemów kanalizacyjnych, głównie na skutek wprowadzania do nich materiałów higienicznych. Jej obecność w ściekach oraz osadach ściekowych wpływa bezpośrednio na przebieg procesów technologicznych w oczyszczalniach oraz na efektywność gospodarki osadowej.

W związku z koniecznością efektywnego zagospodarowania osadów ściekowych oraz ograniczania kosztów eksploatacyjnych oczyszczalni ścieków, prowadzone są intensywne

badania nad metodami umożliwiającymi jednoczesną intensyfikację procesów stabilizacji osadów ściekowych oraz optymalizację ekonomiczną tych działań.

Niniejsza praca doktorska przedstawia działania umożliwiające efektywną obróbkę osadów ściekowych, bez dodatkowego obciążania środowiska substancjami chemicznymi, poprzez wykorzystanie celulolitycznych mikroorganizmów bytujących w osadach ściekowych. Praca doktorska obejmuje pięć publikacji, jedną przeglądową i cztery badawcze, opisujące wpływ działania autochtonicznych celulolitycznych mikroorganizmów i produkowanych przez nie enzymów na efektywność degradacji celulozy i produkcji metanu. Realizowane badania poprzedzone zostały szczegółowym przeglądem literatury (**Publikacja 1**), w którym analizowane były metody wspomagania fermentacji metanowej pod kątem usprawnienia hydrolizy osadów i samej produkcji metanu. W przeglądzie przedstawiono wpływ chemicznej, fizycznej i biologicznej obróbki na hydrolizę osadów ściekowych i efektywność każdej z metod w odniesieniu do oznaczenia takich produktów hydrolizy, jak lotne kwasy tłuszczowe (LKT), chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT) i potencjał metanowy. Ponadto, opisane zostały inhibitory procesu i substancje, które w znaczący sposób wpływają na efektywność fermentacji metanowej. **Publikacja 1** wykazała w szczególności niewielką liczbę badań związanych z optymalizacją wykorzystania biologicznych metod obróbki osadów ściekowych jako metod intensyfikacji fermentacji metanowej i etapu hydrolizy, dając podstawy do postawienia hipotezy badań laboratoryjnych. Przegląd teoretyczny tematu pozwolił na wyodrębnienie słabo zbadanych metod obróbki wstępnej osadów ściekowych, określanych jako biologiczne, a w szczególności takich, w których udział miałyby mikroorganizmy autochtoniczne i produkowane przez nie enzymy. Przegląd literatury pozwolił również na zaplanowanie badań pod kątem wypełnienia luki badawczej, z uwzględnieniem potrzeb i możliwości przemysłu.

W **publikacji 2** opisana została izolacja grzybów celulolitycznych z osadu ściekowego. Wyizolowane zostały grzyby zdolne do wzrostu w warunkach tlenowych i beztlenowych, z założeniem możliwości wykorzystania ich na różnych etapach gospodarowania osadami ściekowymi. Wyizolowano 12 szczepów grzybów celulolitycznych. Siedem z nich było zdolnych do wzrostu w warunkach tlenowych i beztlenowych. Za pomocą sekwencjonowania Sangera regionu ITS1, zidentyfikowanych zostało 5 szczepów. Wszystkie z wyizolowanych grzybów należały do rodzaju *Aspergillus*. Określono, że wyizolowane grzyby były zdolne do degradacji czystej celulozy. Na podstawie aktywności enzymatycznej i efektywności degradacji czystej celulozy,

do testów degradacji celulozy w osadzie ściekowym i testu określającego potencjał metanowy wybrany został jeden szczep, oznaczony jako G3 (*Aspergillus terreus* S011).

Znacząca większość badań opisywanych w literaturze wykorzystuje obróbkę wstępną, prowadzoną przed komorą fermentacji metanowej. W badaniach opisanych w **Publikacji 2**, biologiczna obróbka zastosowana była jako forma wspomaganie procesu prowadzonego już w trakcie testu na potencjał metanowy (AMPTS- ang. Automatic Methane Potential Test). Testowany osad ściekowy zaszczerpiony został strzępkami wyizolowanego grzyba G3 (*Aspergillus terreus* S011). W badaniach wykorzystany został mikroorganizm zamiast samych produkowanych przez niego enzymów, zakładając intensyfikację obróbki i uproszczenie metody wstępnej obróbki osadów, w przypadku potencjału zastosowania w przemyśle. Wprowadzenie wyizolowanego podczas badań autochtonicznego grzyba celulolitycznego z rodzaju *Aspergillus* pozwoliło na uzyskanie wzrostu produkcji biogazu o 11% w odniesieniu do osadu ściekowego niepoddawanego obróbce. Dodatkowo, uzyskano 6% wzrost degradacji celulozy, w porównaniu do próbki kontrolnej. Grzyby uznaje się za najbardziej efektywne, spośród wszystkich mikroorganizmów celulolitycznych. W związku z tym, badania opisane w tej publikacji stanowiły punkt wyjścia dalszych prac badawczych, rozwiniętych w **Publikacjach 3, 4 i 5**.

Kolejne zaplanowane w ramach rozprawy doktorskiej badania zakładały wykorzystanie autochtonicznych bakterii celulolitycznych, wyizolowanych z osadu ściekowego, zwiększających szybkość hydrolizy osadów ściekowych. Podczas badań jednak izolacja czystych kultur bakteryjnych nie była możliwa. Niemożliwe było również przechowywanie wyizolowanych mikroorganizmów, jako że testowane metody zabezpieczania materiału prowadziły do utraty właściwości celulolitycznych wyizolowanych bakterii. Przetestowane zostało mrożenie w glicerynie, liofilizacja i pasażowanie na skosach przechowywanych w temperaturze 4°C. W każdym z analizowanych przypadków, wyizolowane bakterie traciły właściwości celulolityczne. Wyniki te wskazały kierunek badań w stronę mieszanej hodowli o potencjale celulolitycznym, czyli bakterii wyizolowanych z osadu ściekowego, które były zdolne do wzrostu i namnażania w syntetycznej pożywce, w której jedynym źródłem węgla była karboksymetyloceluloza. Mieszana kultura autochtonicznych bakterii o potencjale celulolitycznym została scharakteryzowana pod kątem aktywności enzymatycznej FPA (ang. Filter Paper Assay) i CMC (ang. Carboxymethyl Cellulose) oraz zdolności do degradacji celulozy czystej i celulozy obecnej w osadzie ściekowym.

Badania porównawcze długotrwałego kontaktu enzymów z osadem przedstawione zostały w **Publikacji 3**, w której również weryfikowany był wpływ działania enzymatycznej obróbki osadów ściekowych na stopień degradacji celulozy i potencjału metanowego. Z mieszanej hodowli bakterii autochtonicznych o potencjale celulolitycznym wyizolowane zostały enzymy związane z powierzchnią komórek. Izolacja enzymów wykonana została za pomocą kombinacji metod termiczno-mechanicznych, selekcionowanych pod kątem łatwości ich wykorzystania w oczyszczalni ścieków. Celem zabezpieczenia i zwiększenia możliwości późniejszego użycia, wyizolowane enzymy zostały unieruchomione na nieorganicznym nośniku, jakim był węgiel aktywny. W **Publikacji 3** opisane zostało wykorzystanie enzymów produkowanych przez autochtoniczne bakterie celulolityczne. Podobnie jak w przypadku oddziaływania grzybów, oznaczona została aktywność enzymatyczna mieszanej hodowli bakterii celulolitycznych i efektywność degradacji czystej celulozy. Określony został również potencjał metanowy osadów ściekowych, inokulowanych izolowanymi enzymami, zarówno w formie immobilizowanej, jak i nieimmobilizowanej. Działanie enzymów izolowanych z uzyskanej w tej pracy hodowli zostało porównane z działaniem komercyjnej mieszanki enzymów celulolitycznych Cellic CTec2 (Novozymes, Dania). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono wzrost efektywności degradacji celulozy o 27% w próbkach inokulum i substratu (osadu fermentującego z dodatkiem świeżego osadu ściekowego) poddanych obróbce izolowanymi enzymami nieimmobilizowanymi oraz o 66% w przypadku osadu fermentowanego, niezasilanego świeżą partią osadu nadmiernego i wstępnego. Dodatkowo, uzyskano intensyfikację produkcji metanu o 21,7% w przypadku osadów inokulowanych izolowanymi enzymami nieimmobilizowanymi i o 18,9% w przypadku osadów inokulowanych izolowanymi enzymami immobilizowanymi. W przypadku enzymów komercyjnych obserwowano wzrost produkcji metanu o 42,5% i 27%, odpowiednio dla enzymów nieimmobilizowanych i immobilizowanych.

W **Publikacji 4** przedstawiono krótkotrwały wpływ działania obróbki enzymatycznej z wykorzystaniem enzymów izolowanych z pozyskanej hodowli bakterii i komercyjnych enzymów, nieimmobilizowanych i immobilizowanych na nieorganicznym nośniku, jakim był węgiel aktywny. W trakcie testu opisanego w **Publikacji 4** weryfikowany był wpływ dozowania enzymów izolowanych i komercyjnych na stężenie lotnych kwasów tłuszczowych (LKT), chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) i polimerów zewnątrzkomórkowych (EPS, ang. Extracellular Polymeric Substances). Przeprowadzony test pozwolił na zaobserwowanie zmian stężenia oznaczanych parametrów w pierwszych godzinach

od inokulacji osadu enzymami. W próbkach osadu ściekowego, inokulowanych izolowanymi nieimmobilizowanymi i immobilizowanymi enzymami uzyskano wzrost produkcji LKT odpowiednio o 25% i 128%. Zaobserwowano również wzrost stężenia ChZT o 272% i 73%. W przypadku inokulacji osadów ściekowych komercyjnymi enzymami nieimmobilizowanymi i immobilizowanymi, zaobserwowano wzrost stężenia LKT o 1856% i 175%. Stężenie ChZT całkowite w próbkach inokulowanych komercyjnymi nieimmobilizowanymi i immobilizowanymi enzymami wzrosło odpowiednio o 1792% i 670%.

W Publikacji 5 przedstawiono wpływ działania inokulacji osadów ściekowych izolowanymi i komercyjnymi enzymami immobilizowanymi i nieimmobilizowanymi na parametry fizykochemiczne osadu ściekowego podczas 15-dniowego testu określającego potencjał metanowy badanych osadów. Dodatkowo, weryfikowany był również wpływ dodatku enzymatycznej obróbki osadów ściekowych na zbiorowisko mikroorganizmów bytujących w osadzie. Na podstawie przeprowadzonych badań określono, że wybrany rodzaj obróbki i zastosowane stężenie enzymów nie wpływa w znaczącym statystycznie stopniu na skład jakościowo-ilościowy biocenozy mikroorganizmów osadu ściekowego. Porównanie wyników fizykochemicznych opisanych w **Publikacji 4** i **Publikacji 5** pozwoliło na zaobserwowanie, że wykorzystanie enzymów izolowanych i komercyjnych, zarówno immobilizowanych, jak i nieimmobilizowanych pozwala na uzyskanie takich samych parametrów osadu i ilości produkowanego metanu w krótszym czasie, niż w przypadku osadów niepoddawanych obróbce. W **Publikacji 5** dodatkowo określono korelacje pomiędzy parametrami fizykochemicznymi a obfitością występowania najbardziej licznych gatunków bakterii, wskazując na silne zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych mikroorganizmów i poziomem badanych parametrów. Jednocześnie wykazano, że unieruchomienie enzymów miało większe znaczenie, niż rodzaj zastosowanego enzymu. W sytuacji, kiedy obserwowano negatywną korelację przy wykorzystaniu enzymów nieimmobilizowanych, zastosowanie ich immobilizowanych odpowiedników wpływało na wystąpienie pozytywnej korelacji pomiędzy obfitością występowania danego gatunku i oznaczanego parametru.