POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA I ENERGETYKI

ROZPRAWA DOKTORSKA

Przewodnik po jednotematycznym cyklu publikacji:

NISKOTEMPERATUROWE KONDYCJONOWANIE OSADU CZYNNEGO NADMIERNEGO

mgr inż. Ewelina Nowicka
Akademia Techniczno – Humanistyczna w Bielsku – Białej
Wydział Inżynierii Materiałów, Budownictwa i Środowiska
Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska
Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej

Promotor
dr hab. Alicja Machnicka, prof. ATH

Gliwice 2016 r.

Promotorowi mojej pracy naukowej
Pani prof. ATH, dr hab. Alicji Machnickiej
składam podziękowania za cenne rady i pomoc
udzieloną mi w trakcie wykonywania badań
i redagowania niniejszego przewodnika.

Dziękuję wszystkim,
którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE 5

2. ANALIZA STANU WIEDZY 6

3. CEL PRACY.....10

4. TEZY PRACY 10

5. METODYKA.....11

5.1. Miejsce poboru próbek i materiał doświadczalny.....11

5.2. Metoda dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem.....11

6. METODYKA BADAŃ I ZASTOSOWANE URZĄDZENIA 12

6.1. Analiza fizykochemiczna 12

6.2. Stopień dezintegracji (SD) 13

6.3. Własności grawitacyjne.....13

6.4. Analiza podczerwieni (IR) 14

6.5. Analiza mikroskopowa.....15

6.6. Higienizacja osadu nadmiernego 15

6.7. Fermentacja metanowa.....16

7. OMÓWIENIE WYNIKÓW 18

7.1. Analiza fizykochemiczna 18

7.2. Stopień dezintegracji (SD) 20

7.3. Własności grawitacyjne.....21

7.4. Analiza podczerwieni (IR) 23

7.5. Analiza mikroskopowa.....24

7.6. Higienizacja osadu nadmiernego 25

7.7. Fermentacja metanowa.....27

8. WNIOSKI 29

9. LITERATURA 33

9.1. Publikacje autorki, stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej.....33

9.2. Publikacje, stanowiące aktualny stan wiedzy 35

10. KOPIE PUBLIKACJI, STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ.....42

WYKAZ OZNACZEŃ I SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRZEWODNIKU

BZT	Biochemiczne Zapotrzebowanie na Tlen
$ChZT_{Cr}$	Chemiczne Zapotrzebowanie na Tlen metodą dwuchromianową [mg O_2/dm^3]
DNA	Kwas Dezoksyrybonukleinowy
EBNR	*Enhanced Biological Nutrient Removal*
I.G.O.	Indeks Gęstości Osadu
I.O.O.	Indeks Objętości Osadu
IR	*InfraRed*
K	Kelwin, jednostka temperatury
M	Mol, jednostka bezwymiarowa
MFC	*Microbial Fuel Cell*
ODSL	Osad Dezintegrowany Suchym Lodem
ON	Osad Nadmierny
OP	Osad Przefermentowany
pfu	*Plaque – forming unit*, jednostka tworząca łysinkę
RNA	Kwas Rybonukleinowy
SD	Stopień Dezintegracji [%]

cm^3/g	Jednostka indeksu objętościowego osadu
dm^3	Jednostka objętości, (1000 cm^3)
g	Gram, jednostka masy
g/cm^3	Jednostka indeksu gęstościowego osadu
$g_{s.m.o.}/d \cdot M$	Masa (gramy) suchej masy osadu na dobę na mieszkańca
hPa	Hektopaskal, jednostka ciśnienia, (100 Pa)
MPa	Megapaskal, jednostka ciśnienia, (10^6 Pa)
kg/dm^3	Jednostka masy na jednostkę objętości
kJ	Kilodżul, jednostka energii, (10^3 J)
m^3/d	Jednostka objętości na jednostkę czasu
mg/dm^3	Jednostka stężenia
mm/h	Jednostka długości na jednostkę czasu
µm	Mikrometr, jednostka długości, (10^{-6} m)
µm/s	Jednostka długości na jednostkę czasu
W/m^3	Jednostka mocy na jednostkę objętości

1. WPROWADZENIE

Produktem oczyszczania ścieków, powstającym na skutek szeregu procesów fizycznych, fizykochemicznych i biologicznych, są osady ściekowe. W dobie rozwoju miast i polepszającej się stopy życiowej człowieka, coraz większą uwagę zwraca się na problemy środowiska przyrodniczego oraz na zagadnienia dotyczące oczyszczania ścieków i przeróbki osadów ściekowych.

Osady powstające w oczyszczalni ścieków można podzielić na osady wstępne, osady wtórne, osady z chemicznego strącania oraz osady nadmierne.

Osady nadmierne stanowią część osadu czynnego, które są oddzielone od ścieków w osadniku wtórnym, a następnie zawracane do reaktorów biologicznych. Powstają w wyniku przyrostu mikroorganizmów na skutek usuwania ze ścieków zanieczyszczeń rozpuszczonych i koloidalnych.

W zależności od sposobu prowadzenia procesu oczyszczania ścieków, osady nadmierne zawierają 30 – 50% substancji mineralnych, zawartość wody (bez zagęszczania) wynosi ok. 97%, a skład elementarny to: 50 – 55% C, 6 – 10% H, 25 – 35% O, 10 – 15% N, 1 – 3% P, 0,5 – 1,5% S (Wersocki, 2008). Osad nadmierny, zawierający znaczne ilości bakterii fakultatywnych, jest oporny na procesy rozkładu i stabilizacji, ponieważ osłony komórkowe (błona cytoplazmatyczna i ściana komórkowa) mikroorganizmów stanowią skuteczną ich ochronę przed procesami stabilizacji i odwadniania. Przeciętna produkcja osadu nadmiernego w oczyszczalni wynosi ok. 80 – 100 $g_{s.m.o.}/d \cdot M$ (Żeglin – Kurbiel i in., 2003).

Efekt oczyszczania ścieków i przeróbki osadów ściekowych, zależy od właściwego zaprojektowania, wykonania i eksploatacji oczyszczalni. Ze względu na pochodzenie dopływających ścieków, charakteryzują się one różnorodnym składem, niosąc patogeny i związki ksenobiotyczne. Skutkiem tego, powstające w procesie oczyszczania ścieków osady ściekowe, mogą stanowić zagrożenia sanitarne (bakteriologiczne, parazytologiczne, wirusologiczne, mykologiczne) oraz toksykologiczne dla człowieka oraz środowiska przyrodniczego.

Rolnicze wykorzystanie osadów nadmiernych możliwe jest, jeżeli spełniają one warunki związane z dopuszczalnymi stężeniami metali ciężkich i brakiem patogenów, będących wskaźnikami sanitarnej ich jakości. Obecnie, ocena stanu sanitarnego osadów ściekowych oparta jest o obecność/brak bakterii *Salmonella* sp. i żywych jaj robaków jelitowych: *Ascaris* sp., *Trichuris* sp. i *Toxocara* sp. (Rozporządzenia Ministra Środowiska Dz. U. z 2010 Nr. 137, poz. 924).

Podstawowym celem przeróbki osadów ściekowych jest mineralizacja związków organicznych, prowadząca do stabilizacji osadów oraz zmniejszania ich objętości, co osiąga się w procesach kondycjonowania, odwadniania, suszenia oraz fermentacji metanowej.

Nieustannie dąży się do podwyższania standardów oczyszczania ścieków, zwiększania wymagań efektywności usuwania zanieczyszczeń oraz obniżania kosztów prowadzenia całego procesu oczyszczania. Dlatego poszukuje się sposobów, które dawałyby możliwość osiągnięcia wymaganych efektów podczas przeróbki osadów ściekowych.

Zastosowanie niskotemperaturowego kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego suchym lodem, może stać się alternatywą, która poprzez dużą elastyczność i szerokie możliwości adaptacji, przyczyni się do zwiększania skuteczności technologii przeróbki osadów ściekowych.

2. ANALIZA STANU WIEDZY

Dezintegracyjne metody kondycjonowania osadów ściekowych, należą obecnie do najbardziej intensywnie rozwijających się technologii. Dotyczą one przede wszystkim sposobu redukowania ilości osadów wyprowadzanych z oczyszczalni ścieków (Zielewicz, 2007) oraz polepszania predyspozycji osadu do biochemicznego rozkładu (Worwąg i in., 2008). Dezintegracja jest procesem niszczenia struktury osadu, która polega na rozdrabnianiu, rozerwaniu i niszczeniu kłaczków, destrukcji błony cytoplazmatycznej i ściany komórkowej mikroorganizmów, a tym samym uwalnianiu substancji organicznych, nieorganicznych jak również zewnątrzkomórkowych polimerów do fazy płynnej osadu (Machnicka i in., 2009).

Przeróbka osadów ściekowych, stosuje zróżnicowane techniki dezintegracji np. mechaniczne (sonifikacja, kawitacja hydrodynamiczna) (Machnicka i in., 2012; Wett i in., 2010; Panyue i in., 2007), chemiczne (alkalizacja, zakwaszanie, ozonowanie) (Young – Khee i in., 2007; Guangming i in., 2009; Tak – Hyun i in., 2009), biologiczne (enzymy) (Guang – Hui i in., 2008; Roman i in., 2006; Burgess i Pletschke, 2008) oraz termiczne (obróbka cieplna, zamrażanie/rozmrażanie) [4A] (Xue i Huang, 2007; Jan i in., 2008).

Zjawisko zamrażania/rozmrażania jest procesem powszechnie występującym w przyrodzie, polegającym na przejściu fazowym substancji ciekłej w stan stały. Podstawowym następstwem jakościowym zamarzania i rekrystalizacji jest zmiana struktury substancji ulegającej zamrażaniu/rozmrażaniu, a także ubytek masy w wyniku parowania, czego skutkiem jest zmiana właściwości zamrażanego medium.

Podstawowe mechanizmy zamrażania/rozmrażania osadów ściekowych, stosowane jako metoda kondycjonowania osadów (np. przed beztlenową stabilizacją), znajdują coraz większe zainteresowanie ze względu na możliwość redukcji bakterii chorobotwórczych, zmniejszania biomasy osadów oraz zwiększania produkcji biogazu (Diak i in., 2011). Stwierdzono również, że mechanizm zamrażania/rozmrażania przekształca strukturę kłaczka w większe aglomeraty, redukuje wodę związaną, a co za tym idzie, skutecznie wpływa na odwadnianie osadów ściekowych (Martel, 1989; Vesilind i in., 1999; Jean i in., 2001; Örmeci i Vesilind, 2001; Örmeci, 2004; Tuan i Sillanpää, 2010).

Wang (Wang i in., 1999) i Hong (Hong i in., 1995) porównali efekty sonolizy termicznej z efektami wymrażania w temperaturze –10°C oraz nadźwiękawiania. Stwierdzili, że wzrost ChZT rozpuszczonego był największy dla 30 minut nadźwiękawiania i wymrażania do –10°C, natomiast samo nadźwiękawianie okazało się mało nieskuteczne.

Wpływ dezintegracji osadów poprzez zamrażanie/rozmrażanie (stosując zmienną temperaturę) na właściwości osadów mieszanych (wstępnego i końcowego) z komunalnej oczyszczalni ścieków oceniła Montusiewicz (Montusiewicz i in., 2010). Zbadała m. in. skutki procesu zamrażania/rozmrażania na jakość cieczy nadosadowej. Efekt wymrażania powodował 71% wzrost stężenia związków azotu i 46% wzrost stężenia związków fosforu. Rok później, badacz Kai i in. (Kai i in., 2011) uzyskał podobny wynik, osiągając 74,5% wzrost stężenia azotu amonowego w cieczy osadu, poddanego procesowi zamrażania/rozmrażania.

Badania laboratoryjne, polegające na porównaniu dezintegracji zamrażania/rozmrażania (–18°C) osadów ściekowych z metodami chemicznymi (zakwaszanie, alkalizacja) i termicznymi (60°C), jako wstępnej ich obróbki, przeprowadził Gao w 2011 roku (Gao, 2011). Wykazał, że zamrażanie/rozmrażanie osadów ściekowych jest efektywną metodą w procesie kondycjonowania, co skutkowało 8 – krotnym wzrostem ChZT i azotu amonowego oraz 2,5 – krotnym wzrostem fosforanów w supernatancie.

Kilka lat później naukowcy Chen, Jiang i Zhao (Chen i in., 2014) zbadali skuteczność zamrażania/rozmrażania osadów w celu zwiększania degradacji substancji organicznych dla wzrostu produkcji biogazu i wykorzystania substratu mikrobiologicznego w ogniwie paliwowym (MFC) do produkcji energii elektrycznej. Uzyskane wyniki udowodniły, że długi czas zamrażania osadów (ponad 48 godzin) powodował uwalnianie substratu podatnego na biochemiczny rozkład i możliwość jego przetwarzania w energię elektryczną. Efektywność usuwania ChZT wzrosła z 25,3% (osad wstępny jako substrat) do 66,2%, a maksymalna moc

w MFC została zwiększona z 8,9 W/m³ (osad wstępny jako substrat) do 10,2 W/m³ (Chen i in., 2014).

Szybkość zamrażania/rozmrażania osadu czynnego nadmiernego zweryfikował Lee i Hsu (Lee i Hsu, 1994). Badany osad umieścili w butelkach, który następnie zanurzyli w basenie z wodą i glikolem etylenowym w temperaturze –15°C. Czas potrzebny do całkowitego zamrożenia próbki wynosił ok. 1,5 h, przy średniej szybkości zamrażania 40 mm/h (11 μm/s). Etap rozmrażania przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Stwierdzono, znaczny wzrost BZT i ChZT w cieczy osadowej (Lee i Hsu, 1994).

Istotnym aspektem zamrażania i rozmrażania osadów ściekowych jest rodzaj czynnika wymrażającego. Poszukuje się nowych metod, pozwalających uzyskać wysoki stopień dezintegracji przy zminimalizowaniu nakładów energetycznych, co pozwoliłoby włączyć je w ciąg technologii przeróbki osadów. Na tej podstawie nasunęło się rozwiązanie, dotyczące zastosowania suchego lodu jako innowacyjnej metody udoskonalenia procesu niskotemperaturowego kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego.

Suchy lód to ditlenek węgla w stanie stałym, który powstaje przy rozprężaniu ciekłego ditlenku węgla w warunkach normalnych (temperatura 273,15 K, ciśnienie 1013,25 hPa). Jego temperatura krytyczna wynosi 31°C, a ciśnienie krytyczne 73 830 hPa (Freund i in., 2014). Sublimuje w temperaturze –78,5°C, przy ciśnieniu 1013,25 hPa. Jego ciepło sublimacji wynosi 573 kJ, co powoduje, że jest on ok. 3,3 razy efektywniejszym czynnikiem chłodniczym niż lód wodny (przy tej samej objętości), a rozpuszczalność w wodzie wynosi 0,29 g/100 ml. Ciężar właściwy mieści się w zakresie od 1,2 kg/dm^3 do 1,6 kg/dm^3, natomiast twardość w skali Mohsa wynosi 2, co odpowiada twardości gipsu. Jest to produkt niepalny, nietoksyczny, bezwodny, koloru białego, o odczynie kwaśnym, nie posiada smaku ani zapachu (Kayan, 2014).

Zestalony ditlenek węgla należy do substancji nieklasyfikowanych jako niebezpieczny (nieklasyfikowany jako drażniący dla skóry, oczu, dróg oddechowych oraz nieklasyfikowany jako uczulający dla skóry i po narażeniu wziewnym) zgodnie z dyrektywami (Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 1999/45/WE) i kryteriami rozporządzenia (Rozporządzenie UE nr 453/2010). Suchy lód nie znajduje się w wykazie substancji, które mogą powodować efekt cieplarniany (Rozporządzenie UE nr 842/2006) oraz nie jest niebezpieczny dla warstwy ozonowej (Rozporządzenie UE nr 1005/2009).

Suchy lód wytwarza bakteriostatyczną atmosferę, która poprawia jakość chłodzonych produktów zapobiegając ich utlenianiu. Dlatego stosowany jest jako środek chłodzący w laboratoriach, chłodniach przemysłowych, samodzielnie lub jako składnik mieszanin

oziębiających. Zapobiega rozwojowi grzybów i bakterii, dzięki czemu wykorzystywany jest do transportowania szybko psujących się produktów spożywczych (Costantini i in., 2015). W łaźniach laboratoryjnych, suchy lód stosuje się zazwyczaj w postaci mieszaniny chłodzącej, składającej się z rozdrobnionego suchego lodu i rozpuszczalnika organicznego o niskiej temperaturze krzepnięcia (poniżej –80°C), np. aceton lub etanol. Obecnie wykorzystywany jest do czyszczeń przemysłowych oraz w laboratoriach do spowalniania reakcji egzotermicznych (Ismalaj i Sackett, 2015).

Stały ditlenek węgla w temperaturze pokojowej ulega sublimacji, co powoduje, że mechanizm oddziaływania lotnego ditlenku węgla w środowisku, może niekorzystnie wpływać na stabilność osłon komórkowych mikroorganizmów, a także może powodować niepotrzebne wydatki energii komórkowej. Ponadto, rozpuszczalność ditlenku węgla w wodzie prowadzi do obniżania wartości pH, zakwaszając środowisko oraz powodując wewnątrzkomórkowe stresy, wynikające ze zmian w środowisku (Pikuł, 2005).

Cząsteczki ditlenku węgla są niepolarne, dlatego lepiej rozpuszczają się w lipidach niż w wodzie. Z tego względu, kiedy ditlenek węgla wchodzi w bezpośredni kontakt z bakteryjną błoną cytoplazmatyczną i ścianą komórkową, wybiera rozpuszczanie się w podwójnej warstwie lipidowej. W ten sposób ditlenek węgla, powstały z sublimowanego suchego lodu, zwiększa przepuszczalność osłon komórkowych mikroorganizmów oraz naraża cytoplazmę komórki na stres (Nilsson i in., 2000).

Destrukcyjne działanie niskiej temperatury zależy od: szybkości zamrażania i rozmrażania, składu chemicznego środowiska bytowania mikroorganizmów, gatunku bakterii, czasu zamrażania oraz temperatury. Jednakże, na pierwszym miejscu stawia się mechaniczne uszkodzenia komórek drobnoustrojów, które powodowane jest tworzeniem się kryształów lodu w środowisku otaczającym komórki i w ich wnętrzu oraz częściową utratą wody hydratacyjnej białek, co prowadzi do zmian ich własności (denaturacja). Zwiększające się w procesie mrożenia zewnątrzkomórkowe kryształy, niszczą występujące między nimi komórki drobnoustrojów. Tworzenie się kryształów międzykomórkowych powoduje uszkodzenia biomembran i zmianę ich właściwości, co prowadzi do wycieku substancji wewnątrzkomórkowych do środowiska (Leygonie i in., 2012). Tak więc, proces zamrażania/rozmrażania osadów jest przyczyną: zniszczenia struktury kłaczków osadu, zwiększania objętości zamarzającej wody w cytoplazmie, mechanicznego uszkodzenia osłon komórkowych mikroorganizmów, unieczynnienia białek enzymatycznych i budulcowych, szoku osmotycznego, spadku stabilności drugorzędowych struktur RNA i DNA, zmniejszenia

wydajności replikacji, transkrypcji i translacji DNA w komórkach oraz „zimnej" śmierci drobnoustrojów (El – Kest i Marth, 1992).

3. CEL PRACY

Zainteresowanie procesami dezintegracji osadów ściekowych, wynika przede wszystkim z korzystnego oddziaływania na skuteczność ich wstępnej obróbki. Ze względu na wysokie koszty przeróbki osadów ściekowych, nieustannie poszukuje się nowatorskich technik, umożliwiających osiągnięcie wysokiego stopnia dezintegracji, zwiększenia efektywności usuwania zanieczyszczeń oraz obniżenia kosztów prowadzenia całego procesu oczyszczania.

Analizując literaturę obejmującą dezintegracje osadów ściekowych, można stwierdzić, że do chwili obecnej istnieje stosunkowo niewielka liczba badań i wyników, dotyczącą ich kondycjonowania poprzez zastosowanie procesu zamrażania/rozmrażania.

W konsekwencji ujawniła się, więc koncepcja własna, przedstawiająca możliwość zastosowania suchego lodu jako innowacyjnej metody niskotemperaturowego kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego.

Celem przeprowadzonych badań naukowych było wykazanie destrukcyjnego oddziaływania zestalonego ditlenku węgla na osad czynny nadmierny poprzez:

- jego zmiany fizyczne,
- zmiany chemiczne fazy płynnej osadu,
- zmiany własności grawitacyjnych,
- higienizację,
- wpływ na efektywność fermentacji metanowej.

4. TEZY PRACY

Biorąc pod uwagę założone cele i kierując się przesłankami literaturowymi, sformułowano następujące tezy pracy:

1. Niskotemperaturowe kondycjonowanie osadu czynnego nadmiernego suchym lodem powoduje uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej do cieczy osadu.
2. Proces niskotemperaturowego kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego wpływa na jego własności grawitacyjne.
3. Higienizacja osadu czynnego nadmiernego zestalonym ditlenkiem węgla poprawia jego stan sanitarny.

4. Poddanie osadu czynnego nadmiernego (przeznaczonego do fermentacji) procesowi zamrażania/rozmrażania powoduje wzrost produkcji biogazu.

5. METODYKA

5.1. Miejsce poboru próbek i materiał doświadczalny

Materiał do badań, pochodził z oczyszczalni ścieków zlokalizowanej na terenie województwa śląskiego. Oczyszczalnia ta, stosuje zaawansowane procesy biologicznego oczyszczania ścieków, polegające na równoczesnym usuwaniu związków organicznych oraz biogenów azotu i fosforu (EBNR) ze ścieków. Usuwanie związków biogennych zachodzi z wykorzystaniem sektorów beztlenowych, anoksycznych i tlenowych. Oczyszczalnia została zaprojektowana dla przepływu ścieków 120 000 m^3/d. Natężenie dopływu ścieków do tej oczyszczalni wynosi około 90 000 m^3/d, czas zatrzymania ścieków jest ok. 14 – dniowy, a stężenie suchej masy osadu czynnego w bioreaktorze jest na poziomie 4 320 – 4 640 mg/dm^3.

Materiałem badawczym był osad czynny nadmierny, pobierany za osadnikiem wtórnym ze zbiornika osadu nadmiernego. Pobór próbek o objętości 10 dm^3, odbywał się za pomocą czerpaka, zgodnie z normami (PN – EN ISO 5667 – 3:2005; PN – ISO 5667 – 10:1997). Pobrany materiał dostarczano do laboratorium po 20 – 40 minutach od momentu pobrania.

Stężenie substancji zawieszonej osadu czynnego nadmiernego, wahało się w granicach 9,35 – 10,81 g/dm^3.

5.2. Metoda dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem

Do procesu zamrażania/rozmrażania osadu czynnego nadmiernego zastosowano suchy lód w następujących stosunkach objętościowych osadu do zestalonego ditlenku węgla 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1. Odniesieniem była próbka kontrolna, w której osad nie został poddawany destrukcji termicznej. Osad czynny nadmierny o temperaturze pokojowej i suchy lód mieszano w określonych powyżej stosunkach objętościowych. Następnie próbki poddawano rozmrażaniu w temperaturze pokojowej, aż do całkowitego wysublimowania suchego lodu. Czas rozmrażania próbek osadu wynosił:

- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25 – 1,5 godziny,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,5 – 2 godziny,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,75 – 3 godziny,

- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 – 4,5 godziny.

6. METODYKA BADAŃ I ZASTOSOWANE URZĄDZENIA

6.1. Analiza fizykochemiczna

Próbki osadu czynnego nadmiernego niepoddawanego procesowi zamrażania/rozmrażania jak i po procesie, analizowano fizykochemicznie, wykonując oznaczenia parametrów fazy płynnej osadu, takich jak: wartości chemicznego zapotrzebowania na tlen metodą dwuchromianową ($ChZT_{Cr}$), stężenia protein, węglowodanów, kwasu rybonukleinowego (RNA), azotu amonowego ($N - NH_4^+$), fosforanów (PO_4^{3-}) oraz mętności.

W celu realizacji powyższych oznaczeń, wskazujących na uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej do otaczającej cieczy, próby poddawano odwirowaniu przy użyciu wirówki o prędkości 13 000 obr./min., a następnie przesączano na sączku o średnicy porów 0,45 μm. Poniższe oznaczenia wykonano w oparciu o:

- chemicznego zapotrzebowania na tlen metodą dwuchromianową, azotu amonowego, fosforanów i mętności – Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 22th Edition (APHA, 2012),
- protein – metodę Lowry'ego, zgodnie z Methods for General and Molecular Bacteriology (Gerhardt i in., 2005),
- węglowodanów – procedurę Anthrona'a (Tchobanoglous i in., 2002),
- kwasu rybonukleinowego – Liwarską – Bizukojc i Ledakowicza (Liwarska – Bizukojc i Ledakowicz, 2001).

W analizie fizykochemicznej wykorzystano urządzenia:

- spektrofotometr HACH/DR 4 000 w celu realizowania analiz w oparciu o metodykę HACH,
- spektrofotometr DrLange Xion500 do wykonania analiz w oparciu o metodykę DrLange,
- termoblok COD reactor CR25 firmy ROCKER,
- wirówkę obrotową Centrifuge MPW – 251,
- cieplarkę laboratoryjną Selecta.

Uzyskane wyniki badań opracowano jako średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe (program STATISTICA 6.0).

6.2. Stopień dezintegracji (SD)

W celu określania stopnia rozpadu kłaczków osadu i lizy mikroorganizmów, Kunz i Wagner (Kunz i Wagner, 1994) zaproponowali współczynnik uwarunkowany jako stopień rozdrobnienia (dezintegracji) (SD). Następnie współczynnik ten został zmodyfikowany przez Műller'a (Műller, 1996). W niniejszym opracowaniu poziom dezintegracji osadów dla stosunków objętościowych osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1, oznaczano według Műller'a (Műller, 2000) w następujący sposób:

$$SD = [(ChZT_{Cr1} - ChZT_{Cr2}) / (ChZT_{Cr3} - ChZT_{Cr2})] \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:

SD – stopień dezintegracji,

$ChZT_{Cr1}$ – stężenie w próbce zdezintegrowanej termicznie,

$ChZT_{Cr2}$ – stężenie w próbce niezdezintegrowanej,

$ChZT_{Cr3}$ – stężenie w próbce po chemicznej dezintegracji.

Chemiczną dezintegrację próbki przeprowadzano dodając 1M NaOH do badanego medium w stosunku 1 : 2. Po dodaniu wodorotlenku sodu, próbkę podgrzewano przez 10 minut w temperaturze 90ºC.

Wykorzystano termoblok COD reactor CR25 firmy ROCKER. Z otrzymanych wyników obliczano średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe (program STATISTICA 6.0).

6.3. Własności grawitacyjne

Zakres badań obejmował określanie kinetyki sedymentacji opartej na krzywych opadania osadu i prędkości zagęszczania. Ma tutaj zastosowanie twierdzenia Kyncha, które mówi, że prędkość opadania cząstek osadu jest funkcją stężenia zawiesin w najbliższym jej otoczeniu (Cywiński i in., 1983).

W próbkach osadu, zarówno w kontrolnych jak i tych poddawanych procesowi dezintegracji zamrażania/rozmrażania (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1), na podstawie Tchobanoglous`a i in. (Tchobanoglous i in., 2002), wykonano obliczenia:

6.3.1. Indeksu Gęstości Osadu, na podstawie wzoru:

$$\text{I. G. O.} = \frac{m}{V \cdot 10}\ [\text{g/cm}^3] \tag{2}$$

gdzie:

m – masa zawiesin ogólnych w próbce [g/dm^3],

V – objętość osadu odczytana po 30 minutach sedymentacji próbki o objętości 1000 cm^3 [cm^3/dm^3].

6.3.2. Indeksu Objętości Osadu, na podstawie wzoru:

$$\text{I. O. O.} = \frac{1}{\text{I.G.O.}}\ [\text{cm}^3/\text{g}] \tag{3}$$

6.3.3. Prędkości zagęszczania osadu, na podstawie wzoru:

$$\text{v} = \frac{\text{V}_\text{r} - \text{V}_\text{n}}{\text{t}_\text{n}}\ [\text{mm/min}] \tag{4}$$

gdzie:

V_r – wysokość słupa osadu użyta w procesie sedymentacji [400 mm],

V_n – objętość osadu dla n czasu sedymentacji [mm],

t_n – czas sedymentacji [s].

Zastosowano następujące urządzenia:

- łaźnię wodną laboratoryjną MEMMERT,
- suszarkę laboratoryjną MEMMERT UNE 500,
- wagę analityczną RADWAG XA 100/2X,
- stoper elektroniczny Meteor.

Z otrzymanych wyników wyliczano średnie arytmetyczne.

6.4. Analiza w podczerwieni (IR)

Potwierdzeniem zmian fizykochemicznych w cieczy osadu oraz uwalniania treści komórkowej w wyniku lizy komórek mikroorganizmów, były badania spektrofotometryczne w podczerwieni (ilościowe) wykonane przy pomocy Spektrofotometru Magna – IR firmy

NICOLET i programu OMNIC. Widma wykonywano w zakresie od 4 000 do 400 cm^{-1} z rozdzielczością 4 cm^{-1}.

Analizę w podczerwieni przeprowadzano z cieczy nadosadowej dla stosunków objętościowych osadu nadmiernego do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1. Odniesieniem była próbka kontrolna – ciecz nadosadowa osadu nadmiernego, niepoddawana procesowi zamrażania/rozmrażania. Próby przesączano przez twardy sączek, a pozyskiwaną w ten sposób badaną ciecz, umieszczano na tyglu w celu dalszego odparowania i wygrzewania w 105°C. Po odparowaniu, z pozostałości przygotowywano sprasowane pod ciśnieniem 1000 MPa pastylki, dodając NaCl jako nośnik. Tłem odniesienia była pastylka z czystej soli NaCl. Sporządzone pastylki wstawiano do komory pomiarowej ze zwierciadlanym kolimatorem wiązki, skupiającym 16 – krotnie.

6.5. Analiza mikroskopowa

Potwierdzeniem dla destrukcyjnego działania suchego lodu na osad nadmierny, były przeprowadzane analizy mikroskopowe. Zmiany fizyczne osadu nadmiernego przed i po jego zamrażaniu/rozmrażaniu, określano na podstawie zmian struktury kłaczków stosując:

- skaningowy mikroskop elektronowy LEO 435VP z przystawką EDS,
- mikroskop Nikon Alphaphot – 2 YS jasnego pola i kontrastowo – fazowy sprzężony z kamerą Panasonic GP – KR 222.

6.6. Higienizacja osadu nadmiernego

Do analiz mikrobiologicznych, próbki osadu nadmiernego pobierano do szklanych, sterylnych, szczelnie zamykanych pojemników o objętości 1 dm^3, poddawanych wcześniej 30 minutowej sterylizacji w autoklawie w temperaturze 121°C i ciśnieniu 0,1 MPa. Materiał dostarczano do laboratorium – 20 do 40 minut od momentu pobrania.

Badania mikrobiologiczne wykonywano w osadzie nadmiernym przed i po higienizacji suchym lodem (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1). W próbkach osadu, oznaczano bakterie z rodzaju *Salmonella* sp., *Escherichia coli, Clostridium perfringens* i somatyczne colifagi. Analizę drobnoustrojów przeprowadzano według procedury 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 (Project Routes, 2011 – 2014). Procedura

przeprowadzanej identyfikacji bakterii *Salmonella* sp., była zgodna z kryteriami ustalonymi przez Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition (Holt i in., 1994). Diagnozowanie somatycznych colifagów wykonano zgodnie z normą (ISO 10705-2:2000).

Analizy bakteriologiczne dotyczyły również ogólnej liczby bakterii w osadzie nadmiernym przed i po jego zamrażaniu/rozmrażaniu suchym lodem.

Jako podłoża hodowlane wykorzystywano: agar wzbogacony, agar MSA, MSB, agar ssMSA, agar SMS, Hektoen Enteric Agar, Nutrient Agar, Chromocult agar i SPS agar. W celu sprawdzenia przynależności taksonomicznej bakterii do *Salmonella* sp. i *Escherichia coli* dodatkowo zastosowano test biochemiczny API 20E i test MUCAP.

W badaniach mikrobiologicznych użyto:

- autoklaw Fedegari Autoklaven AG typ FVG,
- autoklaw SMS typu ASVE,
- spektrofotometr DrLange Xion500,
- cieplarki laboratoryjne: Selecta, Incudigit, Pol – Eko, Heratherm,
- wytrząsarkę laboratoryjną Orbi – Shaker oraz Vortex MX – S,
- łaźnię wodną laboratoryjną MEMMERT,
- wirówkę obrotową Centrifuge MPW – 251.

Wyniki analiz mikrobiologicznych przedstawiano jako średnie arytmetyczne.

6.7. Fermentacja metanowa

Analiza wpływu procesu dezintegracji zamrażania/rozmrażania na produkcję biogazu podczas fermentacji metanowej osadu czynnego nadmiernego, prowadzona była z wykorzystaniem termostatowych (35±1ºC) bioreaktorów doświadczalnych, o objętości 3 dm^3. Czas fermentacji wynosił 23 dni. Reaktory wypełniano mieszaniną osadu niezdezintegrowanego (ON) i przefermentowanego jako inoculum (OP) oraz z udziałem objętościowym (20%, 30%, 40%, 50% i 70%) osadu poddawanego dezintegracji suchym lodem (ODSL) (dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu 1 : 1), tj.:

Fermenter 1 – 70% ON + 30% OP,

Fermenter 2 – 50% ON + 30% OP + 20% ODSL,

Fermenter 3 – 40% ON + 30% OP + 30% ODSL,

Fermenter 4 – 30% ON + 30% OP + 40% ODSL,

Fermenter 5 – 20% ON + 30% OP + 50% ODSL,

Fermenter 6 – 30% OP + 70% ODSL.

W trakcie fermentacji systematycznie mierzono objętość powstającego biogazu. Otrzymane wyniki opracowano jako średnie arytmetyczne.

Publikacje autorskie, stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej [1A – 8A], załączono w rozdziale 9.1. niniejszego opracowania. W tekście cytowane są literą „A” po numerze odnośnika.

7. OMÓWIENIE WYNIKÓW

7.1. Analiza fizykochemiczna

Zamrażanie/rozmrażanie osadu nadmiernego powoduje termiczne niszczenie osłon komórkowych mikroorganizmów oraz uwalnianie treści komórkowej mikroorganizmów, co bezpośrednio wiąże się z dostępnością substratów w postaci rozpuszczonej lub koloidalnej do enzymatycznego rozkładu. Proces destrukcji zestalonym ditlenkiem węgla skutkuje zmianami fizykochemicznymi, wyrażonymi zmianami parametrów wskaźnikowych.

Zmiany wartości parametrów fizykochemicznych cieczy towarzyszącej osadowi nadmiernemu, zależały od zastosowanego stosunku objętościowego osadu do suchego lodu. Wraz ze zwiększaniem dawki zestalonego ditlenku węgla do osadu, następowały coraz większe zmiany w oznaczanych stężeniach. Celem oceny skutków procesu zamrażania/rozmrażania na jakość fazy płynnej osadu nadmiernego, było wykonywanie analiz wybranych parametrów dotyczących uwalniania związków organicznych i nieorganicznych.

Z przeprowadzanych analiz uwalnianej materii organicznej (wyrażonej jako $ChZT_{Cr}$), wykazano intensyfikację wartości $ChZT_{Cr}$ w zależności od zastosowanego stosunku objętościowego osadu do suchego lodu. Dezintegracja zestalonym ditlenkiem węgla dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25, przyczyniła się do wzrostu wartości $ChZT_{Cr}$ z przedziału początkowego 63 – 109 mg O_2/dm^3 (osad bez dezintegracji suchym lodem) do 205 – 310 mg O_2/dm^3, a zwiększając dawkę suchego lodu do osadu w proporcji 0,5 : 1; 0,75 : 1; 1 : 1, wartość $ChZT_{Cr}$ wzrosła 9 – krotnie (583 – 889 mg O_2/dm^3) dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 [1A, 3A, 4A, 5A, 6A, 7A, 8A].

Uwalnianie substancji organicznej podczas zamrażania/rozmrażania osadów ściekowych, analizował również badacz Hu (Hu i in., 2011). Uzyskał 15% wzrost wartości $ChZT_{Cr}$, który porównywalny był z przeróbką termiczną osadów (100°C w ciągu 30 minut) (Bougrier i in., 2008) oraz ultradźwiękami (5 minut) (Zhao i in., 2010).

Analogicznie do przyrostu wartości $ChZT_{Cr}$, następowało znaczące uwalnianie protein. Wzrost stężenia białek, związany był również z destrukcyjnym działaniem niskiej temperatury na komórki drobnoustrojów oraz wprowadzaniem do roztworu enzymów i białek strukturalnych.

Do wykazania wpływu zestalonego ditlenku węgla na uwalnianie białek z komórek mikroorganizmów wykorzystano metodę, służącą oznaczaniu stężeń protein stosowaną z

powodzeniem przez innych autorów (Zaia i in., 2000; Raunkjær i in., 1994). Przy destrukcji osadu nadmiernego w stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 0,25, stężenie białek w fazie płynnej zwiększyło się z przedziału 15 – 56 mg/dm^3 (osad niezdezintegrowany) do 78 – 99 mg/dm^3. Kolejny wzrost objętości dawek suchego lodu do osadu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1) powodował zwiększanie stężeń protein do zakresu wartości 206 – 291 mg/dm^3 (7 – krotna intensyfikacja) przy stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 1 [1A, 3A, 5A, 6A].

Skuteczność procesu zamrażania/rozmrażania osadu nadmiernego suchym lodem, została wyrażona także na podstawie zmian stężenia węglowodanów w cieczy osadowej. Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem, prowadziła do intensyfikacji stężenia węglowodanów z zakresu wartości początkowej 12 – 15 mg/dm^3 dla osadu niezdezintegrowanego, do wartości 18 – 26 mg/dm^3 dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25. Zwiększając objętość zestalonego ditlenku węgla w stosunku do osadu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1), otrzymano 5 – krotny (53 – 83 mg/dm^3) wzrost stężenia węglowodanów dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 [1A, 3A, 6A].

Potwierdzeniem niszczenia organizmów, w tym komórek mikroorganizmów poprzez zamrażanie/rozmrażanie osadu nadmiernego, było wykonywanie analiz, dotyczących oznaczania stężeń kwasu rybonukleinowego RNA w fazie płynnej osadu.

W ostatniej dekadzie wielu badaczy do oznaczania stężenia RNA lub DNA posługiwało się metodą Schneider`a przy użyciu gorącego kwasu nadchlorowego (Jöbses i in., 1985; Nielsen i in., 1990). Metoda ta, jest dość pracochłonna, dlatego w publikacji [1A] zaproponowano prostszą technikę, wykorzystującą zimny 0,5 M $HClO_4$ oraz 0,7 M $HClO_4$, 0,3 M KOH (Liwarska – Bizukojc i Ledakowicz, 2001) i spektrofotometr firmy HACH/DR 4 000.

Na podstawie przeprowadzanych badań, dotyczących efektywnego działania zestalonego ditlenku węgla na mikroorganizmy osadu nadmiernego stwierdzono również, iż w miarę podwyższania dawki suchego lodu do osadu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 ; 0,75; 1 : 1), następował wzrost stężenia kwasu RNA w próbkach. Dla próbki kontrolnej (osad bez dezintegracji suchym lodem), stężenie RNA mieściło się w przedziale 9,86 – 10,35 mg/dm^3, natomiast dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, stężenie RNA wzrosło średnio o 2,23 mg/dm^3 (11,7 – 13,2 mg/dm^3) [1A].

Na skutek niszczenia struktur komórek mikroorganizmów suchym lodem, następowało jednocześnie uwalnianie enzymów znajdujących się w protoplaście mikroorganizmów,

których efektem działania hydrolitycznego był rozkład organicznych związków azotowych i fosforowych, a co za tym idzie wzrost stężeń azotu amonowego i fosforanów w cieczy osadowej.

Działanie zestalonego ditlenku węgla na osad nadmierny w stosunkach objętościowych osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 ; 0,75; 1 : 1, powodowało stopniowy wzrost stężenia azotu amonowego w supernatancie. Dla osadu niezdezintegrowanego, stężenie azotu amonowego wynosiło zakres wartości 1,3 – 2 mg N – NH_4^+ /dm^3, a przy stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 1, stężenie N – NH_4^+ zwiększyło się 11 – krotnie (21 – 24 mg N – NH_4^+ /dm^3) [1A, 5A].

Proces zamrażania/rozmrażania osadu suchym lodem (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 ; 0,75; 1 : 1) przyczynił się także, do zwiększania stężenia fosforanów z wartości początkowej zawartej pomiędzy 4,8 – 5,2 mg PO_4^{3-}/dm^3 (osad bez dezintegracji suchym lodem) do wartości końcowej zawartej pomiędzy 120 – 133 mg PO_4^{3-}/dm^3 (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1) [1A, 5A].

Fakt wzmożonego uwalniania biogenów do cieczy nadosadowej w wyniku zamrażania/rozmrażania osadu nadmiernego, może zostać wykorzystany do ich odzysku np. w postaci nawozu wolno rozpuszczalnego (Machnicka i Grűbel, 2016) lub jako donor elektronów w technologii osadu czynnego np. dla procesu denitryfikacji (Surmacz – Górska i in., 1996).

Rozdrabnianie oraz rozrywanie kłaczków osadu nadmiernego, a następnie błony cytoplazmatycznej i ściany komórkowej mikroorganizmów w wyniku zamrażania/rozmrażania, było jednocześnie przyczyną zmiany mętności fazy płynnej osadu. Skutkiem tego, następowało wprowadzanie do roztworu dodatkowego ładunku zawiesin i koloidów pochodzenia organicznego lub nieorganicznego. Mętność zwiększyła się z przedziału początkowego 46 – 96 mg SiO_2/dm^3 dla osadu niezdezintegrowanego do przedziału 120 – 578 mg SiO_2/dm^3 dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 [1A, 2A, 4A, 5A, 7A, 8A]. I w tym przypadku, zmiany jej stężenia, zależały od zastosowanego stosunku objętościowego osadu do suchego lodu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 ; 0,75; 1 : 1).

7.2. Stopień dezintegracji (SD)

Wielu autorów (Műller i in., 1998a; Kopp i in., 1997; Zielewicz – Madej i Sorys, 2005), do oceny stopnia dezintegracji proponuje metody, opierające się na porównaniu danego

sposobu dezintegracji z całkowitym zniszczeniem mikroorganizmów, jakie można osiągnąć po alkalizacji osadu przy użyciu NaOH. Proponowane wskaźniki tj.: czas kontaktu, stężenie NaOH oraz temperatura procesu, różnią się głównie metodyką obróbki chemicznej.

Istotą zdefiniowania stopnia dezintegracji metodą Műller'a (Műller, 2000), na podstawie zależności (1), (pkt. 6.2.) jest pomiar substancji organicznej w cieczy osadu czynnego nadmiernego niepoddawanego zamrażaniu/rozmrażaniu oraz w cieczach po procesach termicznych (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1).

W wyniku destrukcyjnego działania zestalonego ditlenku węgla na osad czynny nadmierny w stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 0,25, stopień dezintegracji ulegał zmianie z przedziału początkowego 13 – 15% do przedziału 22 – 27 % (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,5). Kolejne podwyższanie dawek suchego lodu do osadu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,75; 1 : 1) przyczyniły się do dalszej intensyfikacji stopnia dezintegracji do przedziału 32 – 49% (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1) [1A, 3A, 5A, 6A].

Obliczony stopień dezintegracji zamrażania/rozmrażania potwierdza, że dawka zestalonego ditlenku węgla wpływa na skuteczność lizy komórek mikroorganizmów, czego efektem jest uwalnianie się substancji pozakomórkowych do fazy płynnej osadu.

7.3. Własności grawitacyjne

Podczas zagęszczania osadów ściekowych, zawartość suchej masy w osadach jest zwiększana na skutek sedymentacji cząstek osadu oraz ich komprymacji pod wpływem działania siły ciężkości (Bień i in., 2005). Efektem jest, zmniejszanie zawartości wody wolnej i wody związanej biologicznie oraz zredukowanie objętości osadów ściekowych (Wolski i in., 2010).

Skutkiem poddawania osadu czynnego nadmiernego dezintegracji zamrażania/rozmrażania, było zmniejszanie i rozdrabnianie jego cząstek, a także osłabianie sił wiążących wodę z powierzchnią cząstek fazy stałej. Przekładało się to bezpośrednio na zmianę (zwiększanie) szybkości sedymentacji (zagęszczania) osadu nadmiernego.

Objętość (1 dm^3) osadu nadmiernego niepoddawanego dezintegracji suchym lodem po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa wynosiła 910 cm^3, jednak wraz ze wzrostem dawki suchego lodu do osadu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1), objętość ta ulegała zmniejszaniu. Dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25, objętość osadu po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa osiągnęła

860 cm^3, a dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, objętość osadu po 30 minutach zmniejszyła się do 430 cm^3 [5A, 2A].

Oddziaływanie ujemnej temperatury na osad nadmierny skutkował zmianami Indeksu Gęstości Osadu (I.G.O.) i Indeksu Objętości Osadu (I.O.O.) w odniesieniu do próbki osadu nie poddawanej zamrażaniu/rozmrażaniu. Indeks Donaldsona definiuje się, jako masę zawiesin ogólnych wyrażoną w gramach, jaka przypada na objętość 100 cm^3 osadu poddawanego 30 minutowemu procesowi sedymentacji (Gajkowska – Stefańska i in., 2007). Natomiast Indeks Mohlmana jest odwrotnością indeksu Donaldsona i przedstawia objętość osadu w cm^3 po 30 minutach sedymentacji, przypadająca na 1 g zawiesin ogólnych, oznaczonych w próbce pobranej z osadu czynnego (Gajkowska – Stefańska i in., 2007).

Zmiany wartości I.G.O. i I.O.O zależały od zastosowanej objętości suchego lodu w stosunku do osadu. I.G.O. wzrósł z zakresu wartości 0,61 – 1,09 g/cm^3 (osad bez dezintegracji suchym lodem) do przedziału wartości 1,21 – 1,98 g/cm^3 (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1) [2A]. Działanie destrukcyjne użytego czynnika kondycjonującego osad prowadziło także do spadku wartości I.O.O. Wartość I.O.O. osiągnęła zakres 66 – 74 cm^3/g dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 [2A]. Obniżanie wartości indeksu poniżej 100 $cm^3/g_{s.m.o.}$, wskazuje na wysoką zdolność osadu czynnego nadmiernego do odwadniania w wyniku zastosowanego niskotemperaturowego procesu kondycjonowania.

Jednym z najważniejszych parametrów oceny procesu zagęszczania osadów jest prędkość opadania cząstek osadu, która została także wyliczona dla osadu niepoddawanego dezintegracji suchym lodem oraz dla stosunków objętościowych osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1.

Zmiany prędkości opadania osadu nadmiernego pod wpływem preparowania termicznego suchym lodem przedstawia artykuł 2A. Już w początkowym okresie sedymentacji (0,5 – 3 minut) odnotowano szybki wzrost prędkości opadania osadu dezintegrowanego od 0,13 mm/s do 0,30 mm/s dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1. Związane to było, ze wcześniejszą destrukcją kłaczków, a następnie rosnącą ich koncentracją oraz tworzeniem się agregatów o większej gęstości i mniejszej porowatości w stosunku do skupisk osadu przed dezintegracją.

Uzyskane wyniki badań, potwierdzają korzystny wpływ niskotemperaturowego kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego, jako czynnika intensyfikującego proces sedymentacji. Dodatkowo, zwiększanie objętości suchego lodu do osadu nadmiernego skutkuje likwidacją pęcznienia (zmniejszeniem objętości) i flotacji osadów w stosunku do osadu niezdezintegrowanego. Destrukcja zestalonym ditlenkiem węgla kłaczków i

mikroorganizmów osadu nadmiernego powoduje uwalnianie wody związanej oraz wody związanej biologicznie, co przyczynia się do szybszego odwadniania i lepszego zagęszczania osadu. Skutkuje to zmniejszaniem odległości między kłaczkami osadu, zmniejszaniem ich objętości, wzrostem gęstości, a przez to poprawę własności grawitacyjnych.

Przeprowadzano także badania określające zmiany stężeń osadów niezdezintegrowanych i dezintegrowanych zestalonym ditlenkiem węgla. Otrzymane wyniki zamieszczono w artykułach (po recenzji), znajdujących się w druku:

- „The influence of mechanical and thermal disintegration on gravitational separation of surplus activated sludge". Ecological Chemistry and Engineering A,
- „Wpływ dezintegracji mechanicznej i termicznej na separację grawitacyjną osadu nadmiernego". Proceedings of ECOpole.

7.4. Analiza w podczerwieni (IR)

Dla potwierdzenia uwalniania różnorodnych związków chemicznych z komórek mikroorganizmów podczas destrukcji osadu nadmiernego suchym lodem, zastosowano analizę w podczerwieni.

Spektroskopia IR opiera się na analizie promieniowania pochłanianego z przepuszczalnej przez próbkę wiązki promieniowania elektromagnetycznego. Zakres widma w podczerwieni, obejmuje część widma elektromagnetycznego pomiędzy zakresem widzialnym a zakresem mikrofalowym, a jego bilans energetyczny jest wynikiem drgań walencyjnych i deformacyjnych cząsteczki (Jóźwiak, 2006).

Otrzymywane wyniki badań spektroskopowych, potwierdzają intensyfikację zawartości uwalnianych i rozpuszczanych substancji wewnątrzkomórkowych. W publikacji 1A można zauważyć wzrost absorbancji przy poszczególnych charakterystycznych długościach fal dla oscylatorów ugrupowań chemicznych wraz ze zwiększaniem dawki zestalonego ditlenku węgla do osadu czynnego nadmiernego (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1).

Widma absorpcyjne przy długości fali ok. 3400 cm^{-1}, świadczą o największym wzroście stężeń oscylatorów drgań rozciągających grup karboksylowych (O – H) i amidowych (N – H). Z kolei, w obszarach częstości ok. 2350 cm^{-1} oraz ok. 2950 cm^{-1} i 1400 cm^{-1}, pasma absorbancji wskazują na zwiększanie stężeń grup funkcyjnych tiolowych (S – H) oraz aldehydowych (C – H). Ponadto, widma absorbancji przy długości fali 1100 cm^{-1} wykazują

intensyfikację stężeń oscylatorów drgań C – O, P – O, S – O, które występują w komórkach mikroorganizmów, a ich pasma absorpcyjne nakładają się w tym zakresie widma. Dodatkowo, pasma absorbancji przy długości fali 1650 cm^{-1}, sygnalizują wzrost stężeń dla grup karbonylowych C = O w amidach [1A] (Socrates, 2004).

Zmiany absorbancji dla określonych długości fal w wyniku dezintegracji zamrażania/rozmrażania osadu nadmiernego wykazują uwalnianie białek, peptydów, cukrów, aminokwasów siarkowych, kwasów karboksylowych, estrów, amidów, sulfotlenków organicznych, kwasów nukleinowych i alkoholi. Uwalnianie tych grup chemicznych w cieczy nadosadowej, potwierdza destrukcyjne działanie suchego lodu na mikroorganizmy osadu czynnego nadmiernego, skuteczną lizę komórek oraz zmiany wartości stężeń materii nieorganicznej i organicznej.

Otrzymane wyniki badań spektroskopowych świadczą o skuteczności procesu zamrażania/rozmrażania osadów ściekowych przeprowadzanych przez Hu i innych badaczy (Hu i in., 2011) oraz wzroście zawartości uwalnianych i rozpuszczanych substancji wewnątrzkomórkowych.

7.5. Analiza mikroskopowa

Potwierdzeniem dla uzyskanych wyników fizycznych były także przeprowadzane analizy mikroskopowe z użyciem mikroskopu świetlnego oraz skaningowego mikroskopu elektronowego.

Zamrażanie/rozmrażanie osadu nadmiernego z wykorzystaniem zestalonego ditlenku węgla, skutkowało zmianami w jego strukturze. Zmiany biologiczne badanego osadu wykazały, że dezintegracja suchym lodem powodowała niszczenie kłaczków, niszczenie uporządkowanych układów morfologicznych mikroorganizmów oraz przyczyniała się do ich znacznego rozdrabniania i częściowej homogenizacji, co zostało przedstawione w artykule 5A. Na fotografiach porównawczych można zaobserwować wyraźne różnice w osadzie nadmiernym niepoddawanym dezintegracji zamrażania/rozmrażania do osadu nadmiernego poddawanego procesowi dezintegracji termicznej (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1).

W celu maksymalnego uwalniania substancji organicznej i nieorganicznej z komórek drobnoustrojów, dąży się do uzyskania w procesach dezintegracji, zjawiska dyspersji cząstek fazy stałej osadu wraz ze zmniejszaniem przestrzeni fazy ciekłej. Efektem jest uzyskanie

cząstek jak najmniejszych wymiarów (Barański i Zawieja, 2010). W literaturze wymienia się m. in. wielkość 1,0 mm (Wolny i Kamizela, 2003).

W warunkach laboratoryjnych, na skutek przeprowadzanej dezintegracji zestalonym ditlenkiem węgla osadu nadmiernego, otrzymywano cząstki o zmiennych wymiarach, jednakże nie większe niż 0,4 mm. Uzyskane wymiary cząstek stanowią potwierdzenie skuteczności procesu zamrażania/rozmrażania oraz rozrywania osłon komórkowych i uwalniania do otaczającego środowiska substancji organicznej i nieorganicznej. Strukturę uzyskanej mieszaniny i rozmiary powstałych cząstek dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 przedstawia fotografia, zamieszczona w publikacji 1A.

Ponadto, zmniejszanie wielkości cząstek osadu nadmiernego, wpływa na jego upłynnianie oraz polepszanie właściwości grawitacyjnych, co zostało przedstawione w rozdziale 7.3. niniejszej pracy.

7.6. Higienizacja osadu nadmiernego

Przepisy krajowe i międzynarodowe (Rozporządzenie Ministra Środowiska Dz. U. z 2015, poz. 257; Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2006/12/WE; Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/28/WE) wymagają, aby osad był ustabilizowany i zhigienizowany przed zastosowaniem do celów rolniczych.

Proces niskotemperaturowego kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego suchym lodem, był przyczyną destrukcji kłaczków osadu oraz lizy komórek mikroorganizmów. Zamrażanie/rozmrażanie osadu czynnego nadmiernego zestalonym ditlenkiem węgla przyczyniało się do jego częściowej higienizacji, czego potwierdzeniem są wyniki analiz mikrobiologicznych zawartych w publikacjach 4A, 7A i 8A.

W osadzie nadmiernym niepoddawanym zamrażaniu/rozmrażaniu, ogólna liczba bakterii wahała się w przedziale 16 790 610 – 37 152 848 jtk/$g_{s.m.o.}$. Natomiast, po procesie higienizacji suchym lodem wraz ze wzrostem dawki zestalonego ditlenku węgla do osadu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1), ogólna liczba ulegała redukcji i dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 zmniejszyła się o 76 – 80% [4A, 7A, 8A].

Ze względu na zaobserwowany ostatnio wzrost zakażeń jelitowych typu *gastroenteritis* u ludzi, w 2010 roku wprowadzono nowy wskaźnik bakteryjny *Salmonella* sp. *Salmonella* sp. jest bakterią chorobotwórczą obejmującą ponad 2000 serotypów, występującą w żywności, ściekach, osadach ściekowych i zanieczyszczonej wodzie, będącą przyczyną duru oraz duru

rzekomego (Virella, 2000; Lunn i in., 2010). Minimalna dawka zakaźna tego patogenu wynosi od 10^4 do 10^7 komórek (Leggett i in., 2012), a jej efekt toksycznego działania wynika z uwalniania endotoksyny, w postaci wielkocząsteczkowego kompleksu polisacharydowo – lipidowo – polipeptydowego, zwanego glikolipidem lub lipopolisacharydem (Bitton, 2005).

Higienizacja zestalonym ditlenkiem węgla w zależności od użytych stosunków objętościowych osadu do suchego lodu (1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1) powodowała stopniową redukcję liczby bakterii wskaźnikowej o 84 – 90% (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1) [4A, 7A].

Do 2010 roku wskaźnikiem sanitarnym osadów ściekowych była *Escherichia coli*. Bakteria ta, występuje w środowisku, w ściekach surowych, ściekach oczyszczonych, osadach ściekowych, glebie oraz w wodach powierzchniowych, gdzie określana jest wskaźnikiem zanieczyszczenia fekalnego. Spotykana jest w formie szczepów: enterotoksycznych (ETEC), enteropatogennych (EPEC), enterohemolitycznych (EHEC), enteroinwazyjnych (EIEC) i enteroagregacyjnych (EAggEC). Dawka infekcyjna dla tego patogenu wynosi od 10^6 do 10^9 (Kaper i in., 2004), a dla *E. coli* O157:H7 poniżej 100 komórek (Reinthaler i in., 2003).

W wyniku zastosowanych stosunków objętościowych osadu do suchego lodu (1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1), zaobserwowano obniżenie liczebności *Escherichia coli* w osadzie o 83% dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 [8A].

Potencjalnym wskaźnikiem sanitarnej jakości osadów ściekowych, o którym występują wzmianki w literaturze (Sidhu i Toze, 2009) jest *Clostridium perfringens.* Jest to laseczka bezwzględnie beztlenowa, występująca powszechnie w ściekach, osadach ściekowych, glebie skażonej fekaliami oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Ma zdolność do przeżycia przez długi okres w środowisku, ze względu na możliwość tworzenia w warunkach niekorzystnych endospor. Formy przetrwalne *Clostridium perfringens* wykazują podobieństwo do cyst/oocyst pasożytniczych pierwotniaków jelitowych – są podobnej wielkości i charakteryzują się wysoką odpornością na środki dezynfekcyjne (Kocwa – Haluch i Polus, 2004). *Clostridium* sp. może być patogenem oportunistycznym, ale także związanym z jednostkami chorobowymi (Payment i in., 2002), stąd coraz większe zainteresowanie (technologów) tą bakterią.

Przeprowadzane procesy higienizacji suchym lodem dla stosunków objętościowych osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1, powodowały częściową eliminację *Clostridium perfringens*. Liczba laseczek zgorzeli gazowej ulegała obniżaniu o 85% przy stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 1 [4A, 7A].

Osady ściekowe są skażone wieloma rodzajami wirusów (ponad 140 rodzajów). Szczególne znaczenie mają rodzaje *Enterovirus* i *Rotavirus*. Innymi są somatyczne colifagi występujące w większych ilościach niż wirusy jelitowe, a ich obecność świadczy o zanieczyszczeniu osadów rotawirusami i pałeczkami *Escherichia coli* (Skraber i in., 2002; Mocé – Livina i in., 2003).

W 1 gramie suchej masy osadu niepoddawanego higienizacji suchym lodem, liczba colifagów wynosiła 589 312 pfu, natomiast proces termicznej higienizacji zestalonym ditlenkiem węgla, powodował redukcję bakteriofagów maksymalnie o 81% dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 [8A].

Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska (Rozporządzenia Ministra Środowiska Dz. U. z 2010 Nr. 137, poz. 924) wskaźnikiem sanitarnym osadów ściekowych są również jaja robaków tj.: *Ascaris* sp., *Trichuris* sp., i *Toxocara* sp. Uzupełnieniem analiz mikrobiologicznych, były przeprowadzane badania parazytologiczne. Uzyskane wyniki zamieszczono w publikacjach (po recenzji):

- „Hygienisation of sewage sludge after pre-treatment and two-stage anaerobic digestion for the application in agriculture". Ecological Chemistry and Engineering S,
- „Higienizacja osadu ściekowego wykorzystywanego rolniczo we wstępnej obróbce i dwustopniowej fermentacji". Proceedings of ECOpole.

7.7. Fermentacja metanowa

Najpowszechniejszym procesem utylizacji osadów ściekowych jest proces fermentacji metanowej, powodujący produkcję biogazu, zmniejszanie biomasy osadów oraz redukcję organizmów patogennych. Pozyskiwanie i wykorzystywanie biogazu związane jest, z nieustanie zachodzącymi reakcjami rozkładu biochemicznego w masie osadów ściekowych (Miksch, 2009).

Zrealizowane badania laboratoryjne, zmierzały do oceny możliwości intensyfikacji produkcji biogazu przez dodatek 20%, 30%, 40%, 50% i 70% objętości osadu poddawanego dezintegracji suchym lodem (ODSL) dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1. Ponadto, do próbek poddawanych fermentacji metanowej, doprowadzano stałą objętość osadu przefermentowanego (OP), (30% objętościowo w każdej próbce), pochodzącego z wydzielonych komór fermentacji (oczyszczalnia w województwie śląskim), w celu wprowadzania i zapewniania obecności zaadoptowanej flory bakterii metanogennych.

Aby jednoznacznie ocenić wpływ zamrażania/rozmrażania osadu nadmiernego na proces fermentacji metanowej, określano również efektywność powstawania biogazu w fermentacji osadu czynnego niezdezintegrowanego (ON). Po 23 dobowym procesie, z próbki o objętości 3 dm^3, uzyskano produkcję biogazu wynoszącą 2 096 $cm^3/d \cdot dm^3$ [3A, 6A] oraz wydatek w ilości 721 $cm^3/g_{s.m.org.\ usuniętej}$.

Na podstawie przedstawianych wyników [3A, 6A] stwierdzono, że w bioreaktorze z zdezintegrowanym niskotemperaturowo osadem w objętości 70% (30% OP + 70% ODSL), nastąpiła produkcja biogazu wynosząca 2 408 $cm^3/d \cdot dm^3$. W komorach fermentacyjnych, w których udział objętościowy osadu poddawanego zamrażaniu/rozmrażaniu obejmował 50%, 40% i 20%, osiągnięto produkcję biogazu odpowiednio 2 890 $cm^3/d \cdot dm^3$, 2 826 $cm^3/d \cdot dm^3$ i 2 759 $cm^3/d \cdot dm^3$.

W reaktorze z udziałem objętościowym 30% osadu kondycjonowanego zestalonym ditlenkiem węgla (40% ON + 30% OP + 30% ODSL), otrzymano najwyższą produkcję biogazu 3 124 $cm^3/d \cdot dm^3$ oraz zwiększenie wydatku do poziomu 1 108 $cm^3/g_{s.m.org.\ usuniętej}$. Wzrost powstawania biogazu w stosunku do bioreaktora z osadem niepoddawanym dezintegracji suchym lodem (70% ON + 30% OP) wynosił 49% [3A, 6A].

Niższa produkcja biogazu w komorach fermentacyjnych z zdezintegrowanym osadem w objętości 70%, 50%, 40%, niż w próbce z udziałem objętościowym 30%, prawdopodobnie spowodowana była, zbyt wysokim obciążaniem reaktorów materią organiczną, uwalnianą do cieczy nadosadowej w trakcie procesu zamrażania/rozmrażania. A z kolei, reaktor fermentacyjny, w którym objętość zdezintegrowanego termicznie osadu stanowiło 20%, przypuszczalnie zawierał za małą ilość substratu organicznego.

Potwierdza to również wyliczany wydatek w odniesieniu do produkcji biogazu oraz ubytku materii organicznej podczas procesu fermentacji. Na podstawie otrzymanych wyników powstawania biogazu, wydatek wynosił odpowiednio: 850 $cm^3/g_{s.m.org.\ usuniętej}$ (30% OP + 70% ODSL), 945 $cm^3/g_{s.m.org.\ usuniętej}$ (20% ON + 30% OP + 50% ODSL), 955 $cm^3/g_{s.m.org.\ usuniętej}$ (30% ON + 30% OP + 40% ODSL) i 978 $cm^3/g_{s.m.org.\ usuniętej}$ (50% ON + 30% OP + 20% ODSL).

8. WNIOSKI

Niskotemperaturowe kondycjonowanie osadu czynnego nadmiernego zestalonym ditlenkiem węgla, umożliwiło zrealizowanie celów pracy oraz udowodnienie postawionych tez. Na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników, wyciągnięto następujące wnioski:

1. Zamrażanie/rozmrażanie osadu czynnego nadmiernego suchym lodem powodowało efektywną lizę komórek mikroorganizmów, czego skutkiem było uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej do fazy płynnej osadu.

2. W cieczy nadosadowej osadu nadmiernego, niepoddawanego dezintegracji zestalonym ditlenkiem węgla, stężenie materii organicznej – wyrażonej jako $ChZT_{Cr}$ mieściło się w zakresie 63 – 109 mg O_2/dm^3, a po dezintegracji termicznej dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, wartość ta wynosiła 583 – 889 mg O_2/dm^3, zwiększając się 9 – krotnie.

3. W fazie płynnej osadu nadmiernego niezdezintegrowanego niskotemperaturowo, stężenie protein było na poziomie 15 – 56 mg/dm^3, natomiast przy stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 1, stężenie to wzrosło do 206 – 291 mg/dm^3, czyli podwyższyło się 7 – krotnie.

4. W cieczy osadu nadmiernego bez dezintegracji suchym lodem, stężenie węglowodanów osiągnęło wartość 12 – 15 mg/dm^3, jednakże po zastosowaniu procesu niskotemperaturowego kondycjonowania osadu, stężenie węglowodanów wynosiło 53 – 83 mg/dm^3, uzyskując 5 – krotną intensyfikację dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1.

5. Dla próbki kontrolnej (osad niezdezintegrowany), stężenie kwasu rybonukleinowego RNA w fazie płynnej osadu mieściło się w przedziale 9,86 – 10,35 mg/dm^3, ale dla próbki zdezintegrowanej suchym lodem w stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 1, stężenie RNA wzrosło średnio o 2,23 mg/dm^3 i osiągnęło wartość 11,7 – 13,2 mg/dm^3.

6. W cieczy osadu nadmiernego, który nie był kondycjonowany zestalonym ditlenkiem węgla, stężenie azotu amonowego wahało się w granicach 1,3 – 2 mg $N - NH_4^+ /dm^3$. Po procesie termicznym dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, stężenie $N - NH_4^+$ wynosiło 21 – 24 mg $N - NH_4^+ /dm^3$, wzrastając 11 – krotnie.

7. W osadzie nadmiernym niezdezintegrowanym termicznie, stężenie fosforanów w fazie płynnej osadu, było w przedziale 4,8 – 5,2 mg PO_4^{3-}/dm^3, lecz po jego zamrażaniu/rozmrażaniu suchym lodem dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, stężenie fosforanów podwyższyło się do wartości 120 – 133 mg PO_4^{3-}/dm^3, zatem zintensyfikowało się 25 – krotnie.

8. W fazie płynnej osadu nadmiernego niepoddawanego kondycjonowaniu niskotemperaturowego, mętność cieczy osiągnęła wartość 46 – 96 mg SiO_2/dm^3, podczas gdy dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, mętność stanowiła 120 – 578 mg SiO_2/dm^3, a tym samym wzrosła 6 – krotnie.

9. Wraz z intensyfikacją dawki zestalonego ditlenku węgla w stosunku do osadu nadmiernego (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1), zwiększał się stopień dezintegracji (SD), który wynosił odpowiednio: $SD_{ChZT\ 1:0,25}$ = 13 – 15%, $SD_{ChZT\ 1:0,5}$ = 22 – 27%, $SD_{ChZT\ 1:0,75}$ = 27 – 39%, $SD_{ChZT\ 1:1}$ = 32 – 49%.

10. Przeprowadzane badania dotyczące oddziaływania niskotemperaturowego kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego na jego sedymentację i zagęszczanie wykazały, iż zestalony ditlenek węgla wpływał znacząco na strukturę badanego materiału poprawiając jego własności grawitacyjne.

11. Objętość (1 dm^3) osadu nadmiernego bez dezintegracji suchym lodem po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa wynosiła 910 cm^3. Natomiast objętość (1 dm^3) osadu poddawanego zamrażaniu/rozmrażaniu zestalonym ditlenkiem węgla dla stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 1, po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa obniżyła się do 430 cm^3.

12. Zwiększanie objętości zestalonego ditlenku węgla w stosunku do osadu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1), skutkowało wzrostem Indeksu Gęstości Osadu z 0,61 – 1,09 g/cm^3 (osad niepoddany dezintegracji suchym lodem) do:
    - 0,98 – 1,36 g/cm^3 (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25),
    - 1,23 – 1,56 g/cm^3 (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,5),
    - 1,20 – 1,79 g/cm^3 (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,75),
    - 1,21 – 1,98 g/cm^3 (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1),

    oraz spadkiem Indeksu Objętości Osadu z 101 – 125 cm^3/g (osad niepoddany dezintegracji suchym lodem) do:
    - 74 – 93 cm^3/g (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,25),
    - 52 – 80 cm^3/g (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,5),
    - 60 – 79 cm^3/g (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 0,75),
    - 66 – 74 cm^3/g (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1).

13. Analiza w podczerwieni potwierdziła zniszczenie struktury związków budujących komórki mikroorganizmów, w wyniku zamrażania/rozmrażania osadu czynnego nadmiernego zestalonym ditlenkiem węgla. Wzrost stężenia oscylatorów drgań O – H, N – H, C – H, S – H, C – O, P – O, S – O, C = O, są wynikiem rozkładu białek, peptydów, cukrów, aminokwasów siarkowych, kwasów karboksylowych, estrów, amidów, sulfotlenków organicznych, kwasów nukleinowych i alkoholi. Ujawnianie się tych grup chemicznych, świadczy o destrukcyjnym oddziaływaniu suchego lodu na strukturę osadu nadmiernego oraz skuteczną lizę komórek mikroorganizmów.

14. Na podstawie analizy mikroskopowej wykazano destrukcyjne działanie zestalonego ditlenku węgla na osad nadmierny spowodowane rozrywaniem kłaczków, przyczyniając się do ich znacznego rozdrabniania i częściowej homogenizacji oraz niszczeniem uporządkowanych układów morfologicznych mikroorganizmów.

15. Proces niskotemperaturowego kondycjonowania powodował częściową higienizację osadu czynnego nadmiernego.

16. Oddziaływanie na osad ściekowy zestalonym ditlenkiem węgla w stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1 : 1, powodowało redukcję:
    - ogólnej liczby bakterii o 76 – 80%,
    - sanitarnego wskaźnika bakteryjnego osadów ściekowych *Salmonella* sp. o 84 – 90%,
    - *Escherichia coli* o 83%,
    - *Clostridium perfringens* o 85%,
    - somatycznych colifagów o 81%.

17. Udział objętościowy (20%, 30%, 40%, 50% i 70%) zdezintegrowanego osadu czynnego nadmiernego zestalonym ditlenkiem węgla, oddziaływał na intensywniejszą produkcję biogazu, w porównaniu do powstawania biogazu z próbki z osadem niezdezintegrowanym. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że wprowadzanie do reaktora fermentacyjnego 30% objętościowo osadu kondycjonowanego suchym lodem, znacząco intensyfikuje i podnosi efektywność produkcji biogazu – uzyskano wzrost o 49%.

9. LITERATURA

9.1. Publikacje autorki, stanowiące przedmiot rozprawy doktorskiej

[1A] **Nowicka E.**, Machnicka A. (2015) Confirmation of effectiveness surplus activated sludge dry ice disruption by infrared wave analysis. Slovakia: Tatranské Matliare. The 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, 531 – 551.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na prowadzeniu prac eksperymentalnych, analizie i opracowaniu uzyskanych wyników, zbieraniu piśmiennictwa oraz pisaniu powyższej pracy.
Jestem autorką korespondencyjną pracy.

[2A] **Nowicka E.**, Grűbel K., Machnicka A. (2015) Polepszenie własności grawitacyjnych osadu nadmiernego poddanego wstępnej obróbce. Inżynieria Ekologiczna. 41, 90 – 96. DOI: 10.12912/23920629/1832.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu badań dotyczących dezintegracji, ich przeprowadzenie, opracowaniu wyników i pisaniu pracy.

[3A] **Nowicka E.**, Machnicka A., Grűbel K. (2014) Improving of anaerobic digestion by dry ice disintegration of activated sludge. Ecological Chemistry and Engineering A. 21(2), 211 – 219. DOI: 10.2428/ecea.2014.21(2)17.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu badań, opracowaniu uzyskanych wyników, zbieraniu piśmiennictwa, pisaniu pracy.
Jestem autorką korespondencyjną pracy.

[4A] **Nowicka E.**, Machnicka A. (2014) Hygienization of surplus activated sludge by dry ice. Ecological Chemistry and Engineering S. 21(4), 651 – 660. DOI: 10.1515/eces-2014-0047. DOI: 10.1515/eces-2014-0047.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu badań mikrobiologicznych i fizykochemicznych, zbieraniu piśmiennictwa, opracowaniu wyników i pisaniu pracy. Jestem autorką korespondencyjną pracy.

[5A] **Nowicka E.**, Machnicka A. (2014) Wpływ dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem na uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej. Gaz Woda i Technika Sanitarna. 8, 307 – 310.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na przeprowadzeniu badań, opracowaniu wyników i pisaniu pracy.

[6A] **Nowicka E.**, Machnicka A., Grübel K. (2014) Wykorzystanie suchego lodu do dezintegracji osadu czynnego nadmiernego w celu intensyfikacji procesu fermentacji metanowej. Proceedings of ECOpole. 8(1), 239 – 247. DOI: 10.2429/proc.2014.8(1)031.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wspólnym wykonywaniu badań, opracowaniu uzyskanych wyników, zbieraniu piśmiennictwa, pisaniu pracy.
Jestem autorką korespondencyjną pracy.

[7A] **Nowicka E.**, Machnicka A. (2014) Higienizacja osadu nadmiernego suchym lodem. Proceedings of ECOpole. 7(2), 673 – 678. DOI: 10.2429/proc.2013.7(2)088.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonywaniu badań mikrobiologicznych i fizykochemicznych, zbieraniu piśmiennictwa, opracowaniu wyników i pisaniu pracy. Jestem autorką korespondencyjną pracy.

[8A] **Nowicka E.**, Machnicka A. (2013) Ocena skuteczności higienizacji osadu nadmiernego suchym lodem. Gliwice: Monografia. Współczesne problemy ochrony środowiska, 105 – 113.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na prowadzeniu prac eksperymentalnych, zbieraniu piśmiennictwa, analizie i opracowaniu wyników oraz pisaniu pracy.

9.2. Publikacje, stanowiące aktualny stan wiedzy

[1] APHA (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd edition). USA: Washington. American Public Health Association.

[2] Barański M. i Zawieja I. (2010) Wpływ termicznej hydrolizy na zmiany struktury osadów nadmiernych poddanych stabilizacji beztlenowej. Inżynieria i Ochrona Środowiska. 13, 85 – 91.

[3] Bień J., Kamizela T., Kowalczyk M. (2005) Separacja grawitacyjna osadów poddanych kondycjonowaniu polem ultradźwiękowym. Zintegrowane, inteligentne systemy wykorzystania energii odnawialnej. Częstochowa – Podlesie: Materiały konferencyjne. 1 – 10.

[4] Bitton G. (2005) Wastewater Microbiology. Third Edition. New Jersey: John Wiley and Sons. DOI: 10.1002/0471717967.

[5] Bougrier C., Delgenès J. P., Carrère H. (2008) Effects of thermal treatments on five different waste activated sludge samples solubilisation, physical properties and anaerobic digestion. Chemical Engineering Journal. 139, 236 – 244. DOI: 10.1016/j.cej.2007.07.099.

[6] Burgess J. E. i Pletschke B. I. (2008) Hydrolytic enzymes in sewage sludge treatment: A mini – review. Water SA. 34, 343 – 350.

[7] Chen Y., Jiang J., Zhao Q. (2014) Freezing/thawing effect on sewage sludge degradation and electricity generation in microbial fuel cell. Water Science Technology. 70, 444 – 449. DOI: 10.2166/wst.2014.226.

[8] Costantini A., Vaudano E., Cravero M. C., Petrozziello M., Bernasconi A., Garcia – Moruno E. (2015) Application of dry – ice blasting for barrels treatment. BIO Web of Conferences. 5, 1 – 4. DOI: 10.1051/bioconf/20150502012.

[9] Cywiński B., Gdula S., Kempa E., Kurbiel J., Płoszański H. (1983) Oczyszczanie ścieków. Tom 1 – Oczyszczanie mechaniczne i chemiczne. Warszawa: Arkady.

[10] Diak J., Örmeci B., Proux C. (2011) Freeze – thaw treatment of RBC sludge from a remote mining exploration facility in subarctic Canada. Water Science Technology. 63, 1309 – 1313. DOI: 10.2166/wst.2011.376.

[11] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 1999/45/WE z dnia 31 mja 1999 r.

[12] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2006/12/WE z dnia 5 kwietnia 2006 roku w sprawie odpadów.

[13] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/28/WE z dnia 23 kwietnia 2009 r. w sprawie promowania stosowania energii ze źródeł odnawialnych zmieniająca i w następstwie uchylająca dyrektywy 2001/77/WE oraz 2003/30/WE.

[14] El – Kest S. E. i Marth E. H. (1992) Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: a review. Journal of Food Protection. 55, 639 – 648.

[15] Freund P., Bachu S., Simbeck D., Thambimuthu K. (2014) Properties of CO_2 and carbon – based fuels. Climate Change. Annex I, 383 – 400.

[16] Gajkowska – Stefańska L., Guberski S., Gutowski W., Mamak Z., Szperliński Z. (2007) Laboratoryjne badania wody, ścieków i osadów ściekowych. Część II. Warszawa: Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej.

[17] Gao W. (2011) Freezing as a combined wastewater sludge pretreatment and conditioning method. Desalination. 268, 170 – 173. DOI: 10.1016/j.desal.2010.10.014.

[18] Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. (2005) Methods for general and molecular bacteriology. Washington: American Society for Microbiology.

[19] Guang – Hui Y., Pin – Jing H., Li – Ming S., Yi – Shu Z. (2008) Extracellular proteins, polysaccharides and enzymes impact on sludge aerobic digestion after ultrasonic pretreatment. Water Research. 42, 1925 – 1934. DOI: 10.1016/j.watres.2007.11.022.

[20] Guangming Z., Jing Y., Huanzhi L., Jie Z. (2009) Sludge ozonation: disintegration, supernatant changes and mechanisms. Bioresource Technology. 100, 1505 – 1509. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.08.041.

[21] Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.

[22] Hong S. G., Young J. D., Chen G. W., Chang I. L., Hung W. T., Lee D. J. (1995) Freeze/thaw treatment on waste activated sludge: a FTIR spectroscopic study. Journal of Environmental Science and Health. Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology. 30, 1717 – 1726. DOI: 10.1080/10934529509376298.

[23] Hu K., Jiang J. Q., Zhao Q. L., Lee D. J., Wang K., Qiu W. (2011) Conditioning of wastewater sludge using freezing and thawing: Role of curing. Water Research. 45, 5969 – 5976. DOI: 10.1016/j.watres.2011.08.064.

[24] Ismalaj T. i Sackett D. L. (2015) An inexpensive replacement for dry ice in the laboratory. Analytical Biochemistry. 474, 38 – 39. DOI:10.1016/j.ab.2015.01.008.

[25] Jan T. W., Adav S. S., Lee D. J., Wu R. M., Su A., Tay J. H. (2008) Hydrogen fermentation and methane production from sludge with pretreatments. Energy Fuels. 22, 98 – 102. DOI: 10.1021/ef700278j.

[26] Jean D. S., Lee D. J., Chang C. Y. (2001) Direct sludge freezing using dry ice. Advances Environmental Research. 5, 145 – 150. DOI: 10.1016/S1093-0191(00)00052-6.

[27] Jöbseb I. M. L., Egberts G. T. C., Baalen A., Roels J. A. (1985) Mathematical modelling of growth and substrate converson of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35°C. Biotechnology and Bioengineering. 27, 984 – 995. DOI: 10.1002/bit.260270709.

[28] Jóźwiak H. (2006) Wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni do indentyfikacji wyrobów budowlanych. Prace Instytutu Techniki Budowlanej. 2 (138), 47 – 55.

[29] Kai H., Jun – Qiu J., Qing – Liang Z., Duu – Jong L., Kun W., Wei Q. (2011) Conditioning of wastewater sludge using freezing and thawing. Role of curing. Water Research. 45, 5969 – 5970. DOI: 10.1016/j.watres.2011.08.064.

[30] Kaper J. B., Nataro J. P., Mobley H. L. T. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews. Microbiology. 2, 123 – 140. DOI: 10.1038/nrmicro818.

[31] Kayan C. F. (2014) Dry ice. In AccessScience. McGraw – Hill Education. DOI: 10.1036/1097-8542.205900.

[32] Kocwa – Haluch R. i Polus M. (2004) Występowanie patogennych pierwotniaków jelitowych w wodzie wodociągowej. Część II: Usuwanie cyst i oocyst patogennych pierwotniaków jelitowych z wody przeznaczonej do picia. Czasopismo Techniczne Politechniki Krakowskiej. 8Ś, 113 – 124.

[33] Kopp J., Műller J., Dicht N., Schwedes J. (1997) Anaerobic digestion and dewatering characteristic of mechanically disintegrated excess sludge. Water Science Technology. 36, 129 – 136. DOI: 10.1016/S0273-1223(97)00694-X.

[34] Kunz P. i Wagner S. (1994) Results and outlooks of investigations of sewage sludge disintegration – Ergebnisse und Perspektive aus Untersuchungen zur Klärschlammdesintegration. Heft 1: AWT Abwassertechnik.

[35] Lee D. J. i Hsu Y. H. (1994) Fast freeze/thaw process on excess activated sludge: floc structure and sludge dewaterability. Environmental Science and Technology. 28, 1444 – 1449. DOI: 10.1021/es00057a011.

[36] Leggett H. C., Cornwallis Ch. K., West S. A. (2012) Mechanisms of pathogenesis, infective dose and virulence in human parasites. PLoS Pathogens: A Peer – Reviewed Open – Access Journal. 8(2): e1002512. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002512.

[37] Leygonie C., Britz T. J., Hoffman L. C. (2012) Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review. Meat Science. 91, 93 – 98. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.01.013.

[38] Liwarska – Bizukojc E. i Ledakowicz S. (2001) RNA assay as a method of viable biomass determination in the organic fraction of municipal solid waste suspension. Biotechnology Letters. 23, 1057 – 1060. DOI: 10.1023/A:1010550205658.

[39] Lunn A. D., Fàbrega A., Sánchez – Céspedes J., Vila J. (2010) Prevalence of mechanisms decreasing quinolone – susceptibility among *Salmonella* spp. clinical isolates. International Microbiology. 13(1), 15 – 20. DOI: 10.2436/20.1501.01.107.

[40] Machnicka A. i Grűbel K. (2016) Investigation of the effectiveness of nutrient release from sludge foam after hybrid pretreatment processes by IR analysis and EDX Quantification. Environmental Technology. DOI: 10.1080/09593330.2016.1177120. In press.

[41] Machnicka A., Grűbel K., Rusin A. (2012) Hygienisation of surplus activated sludge by hydrodynamic cavitation. Ecological Chemistry and Engineering S. 19, 415 – 421. DOI: 10.2478/v10216-011-0031-x.

[42] Machnicka A., Grűbel K., Suschka J. (2009) The use of hydrodynamic disintegration as a means to improve anaerobic digestion of activated sludge. Water SA. 35, 129 – 132.

[43] Martel C. J. (1989) Dewaterability of freeze/thaw conditioned sludges. Journal Water Pollution Control Control Federation. 61(2), 237 – 241.

[44] Miksch K. (2009) Zastosowanie biotechnologii w oczyszczaniu wody, ścieków, gruntów i gazów oraz utylizacji odpadów. Lublin: Monografia. Polska Inżynieria Środowiska, pięć lat po wstąpieniu do Unii Europejskiej, 71 – 92.

[45] Mocé – Livina L., Muniesa M., Pimenta – Vale H., Lucena F., Jofre J. (2003) Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. Applied and Environmental Microbiology. 69, 1452 – 1456. DOI: 10.1128/AEM.69.3.1452-1456.2003.

[46] Montusiewicz A., Lebiocka M., Rożej A., Zacharska E., Pawłowski L. (2010). Freezing/thawing effects on anaerobic digestion of mixed sewage sludge. Bioresource Technology. 101, 3466 – 3473. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.125.

[47] Müller J. (1996) Mechanical disintegration of sewage sludge – Mechanischer Klärschlammaufschluß, Schriftenereihe ”Berichte aus der Verfahrenstechnik” der

Fakultät für Maschinenbau und Elektrotechnik der Universität Braunschweig. Germany: Shaker Verlag. Aachen.

[48] Müller J. (2000) Disintegration as key – stop in sewage sludge treatment. Water Science Technology. 41, 123 – 139.

[49] Műller J., Lehne G., Schwedes J., Battenberg S., Näveke R., Kopp J., Dichtl N. (1998a) Disintegration of sewage sludge and influence on anaerobic digestion. Water Science Technology. 38, 425 – 433. DOI: 10.1016/S0273-1223(98)00720-3.

[50] Nielsen J., Nikolajsen K., Villadsen J. (1990) Application of flow – injection analysis in the on – line monitoring of sugars, lactic, acid, protein and biomass during lactic acid fermentations. Analytica Chimica Acta. 237, 165 – 175. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)83914-8.

[51] Nilsson L., Chen Y., Chikindas M. L., Huss H. H., Gram L., Montville J. (2000) Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. 66, 769 – 774.

[52] Norma ISO 10705-2:2000 Jakość wody – Wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakteriofagów – Część 2: Wyliczanie somatycznych colifagów.

[53] Örmeci B. (2004) Freeze – thaw conditioning of activated sludge: effect of monovalent, divalent and trivalent cations. Journal of Residuals Science & Technology. 1, 143 – 150.

[54] Örmeci B. i Vesilind P.A. (2001) Effect of dissolved organic material and cations on freeze – thaw conditioning of activated and alum sludges. Water Research. 35, 4299 – 4306. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00174-9.

[55] Panyue Z., Guangming Z., Wei W. (2007) Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation Bioresource Technology. 98, 207 – 210. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.12.002.

[56] Payment P., Godfree A., Sartory D. (2002) Clostridium. Encyclopedia of Environmental Microbiology. New York: Wiley – Interscience, 861 – 871.

[57] Pikuł J. (2005) Wpływ dodatku dwutlenku węgla na ograniczenie wzrostu bakterii i jakość surowego mleka. Chłodnictwo. 7, 30 – 34.

[58] Polska Norma, PN – ISO 5667 – 10:1997 Jakość wody – Pobieranie próbek – Wytyczne pobierania próbek ścieków.

[59] Polska Norma, PN – EN ISO 5667 – 3:2005 Jakość wody – Pobieranie próbek – Część 3: Wytyczne dotyczące utrwalania i postępowania z próbkami wody.

[60] 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 *Salmonella* sp., *E. coli, Clostridium perfringens* and colifages in sludge, soils and organic fertilizers: Pour plate method for quantification, University of Barcelona.

[61] Raunkjær K., Hvitved – Jacobsen T., Nielsen P. H. (1994) Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. Water Research. 2, 251 – 262. DOI: 10.1016/0043-1354(94)90261-5.

[62] Reinthaler F., Posch J., Feierl G., Wüst G., Haas D., Ruckenbauer G., Maschar F., Marth E. (2003) Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Research. 37, 1685 – 1690. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00569-9.

[63] Roman H. J., Burgess J. E., Pletschke B. I. (2006) Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. African Journal Biotechnology. 5, 963 – 967.

[64] Rozporządzenia Ministra Środowiska (Dz. U. z 2010 Nr. 137, poz. 924).

[65] Rozporządzenie Komisji Unii Europejskiej nr 1005/2009 z dnia 16 września 2009 r.

[66] Rozporządzenie Komisji Unii Europejskiej nr 453/2010 z dnia 10 maja 2010 r.

[67] Rozporządzenie Komisji Unii Europejskiej nr 842/2006 z dnia17 maja 2006 r.

[68] Rozporządzenie Ministra Środowiska (Dz. U. z 2015, poz. 257).

[69] Sidhu J. P. S., i Toze S. G. (2009) Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. Environmental International. 35, 187 – 201. DOI: 10.1016./j.envint.2008.07.006.

[70] Skraber S., Gantzer C., Maul A., Schwartzbrod L. (2002) Fate of bacteriophages and bacterial indicators in the Moselle river. Water Research. 36, 3629 – 3637. DOI: 10.1016/S0043-1354(02)00063-5.

[71] Socrates G. (2004). Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts. 3rd edition. England: John Wiley & Sons LTD.

[72] Surmacz – Górska J., Gernaey K., Demuynck C., Vanrolleghem P., Verstraete W. (1996) Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. Water Research. 30, 1228 – 1236. DOI: 10.1016/0043-1354(95)00280-4.

[73] Tak – Hyun K., Sang – Ryul L., Youn – Ku N., Jeongmok Y., Chulhwan P., Myunjoo L. (2009) Disintegration of excess activated sludge by hydrogen peroxide oxidation. Desalination. 246, 275 – 284. DOI: 10.1016/j.desal.2008.06.023.

[74] Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D. (2002) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse (4th edition) New York: Metcalf & Eddy Inc.

[75] Tuan P. A. i Sillanpää M. (2010) Migration of ions and organic matter during electro – dewatering of anaerobic sludge. Journal of Hazardous Materials. 15, 173 (1 – 3), 54 – 61. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.08.046.

[76] Vesilind P. A., Wallinmaa S., Martel C. J. (1999) Freeze – thaw sludge conditioning and double layer compaction. Canadian Journal of Civil Engineering. 18, 1078 – 1083. DOI: 10.1139/l91-130.

[77] Virella G. (2000) Microbiology and infectious diseases. Baltimor: Wyd. Williams & Willins a Waverly Company.

[78] Wang Q., Kuninobu M., Kakimoto K., Ogawa H., Kato Y. (1999) Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by ultrasonic pretreatment. Bioresource Technology. 68, 309 – 313. DOI: 10.1016/S0960-8524(98)00155-2.

[79] Wersocki S. (2008) Badania dostępności tlenu w higienizacji osadu czynnego nadmiernego z wykorzystaniem trzciny *Miscanthus* jako materiału strukturotwórczego. Rozprawa Doktorska. Gdańsk: Politechnika Gdańska. Katedra Technologii Chemicznej.

[80] Wett B., Phothilangka P., Eladawy A. (2010) Systematic comparison of mechanical and thermal sludge disintegration technologies. Waste Management. 30, 1057 – 1062. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.12.011.

[81] Wolny L. i Kamizela T. (2003) Technika dezintegracji ultradźwiękowej w technologii ścieków i osadów ściekowych. Ekologia i Technika. 11, 3 – 7.

[82] Wolski P., Wolny L., Zawieja I. (2010) Kondycjonowanie osadów nadmiernych poddanych stabilizacji a ich odwadnialność. Inżynieria i Ochrona Środowiska. 13, 67 – 77.

[83] Worwąg M., Brzeska K., Zawieja I., Bień J. (2008) Stabilizacja beztlenowa osadów ściekowych pochodzących z przemysłu celulozowo – papierniczego. Proceedings of ECOpole. 2, 493 – 498.

[84] Xue T. i Huang. X. (2007) Releasing characteristics of phosphorus and other substances during thermal treatment of excess sludge. Journal of Environmental Science. 19, 1153 – 1158. DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60188-0.

[85] Young – Khee O., Ki – Ryong L., Kwang – Baik K., Ick – Tae Y. (2007) Effects of chemical sludge disintegration on the performances of wastewater treatment by membrane bioreactor. Water Research. 41, 2665 – 2671. DOI: 10.1016/j.watres.2007.02.028.

[86] Zaia D. A. M., Verri V. A., Zaia C. T. B. V. (2000) Determination of total proteins in several tissues of rat: A comparative study among spectrophotometric methods. Microchemical Journal. 64, 235 – 239. DOI: 10.1016/S0026-265X(00)00017-5.

[87] Zhao Q. L., Hu K., Miao L. J., Wang K. (2010) Effect of Ultrasonic Treatment on Characteristics of Waste Activated Sludge. Bioinformatics and Biomedical Engineering (iCBBE). 4th International Conference on, 1 – 4. DOI: 10.1109/ICBBE.2010.5517867.

[88] Zielewicz – Madej E. i Sorys P. (2005) Ultradźwiękowa dezintegracja osadu nadmiernego przed stabilizacją beztlenową. II Kongres Inżynierii Środowiska. Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska PAN. Tom 1. 32, 981 – 989.

[89] Zielewicz E. (2007) Dezintegracja ultradźwiękowa osadu nadmiernego w pozyskiwaniu lotnych kwasów tłuszczowych. Gliwice: Politechnika Śląska. Zeszyty Naukowe.

[90] Żeglin – Kurbiel K., Banaś J., Cimochowicz – Rybicka M. (2003) Nowe biotechnologie i kontrola osadów ściekowych do spełnienia wymagań przepisów Unii Europejskiej. Czasopismo Techniczne, Z. 4 –Ś, 113 – 126.

10. KOPIE PUBLIKACJI, STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

[1A]

Nowicka E., Machnicka A. (2015) Confirmation of effectiveness surplus activated sludge dry ice disruption by infrared wave analysis. Slovakia: Tatranské Matliare. The 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, 531 – 551.

Slovak Society of Chemical Engineering
Institute of Chemical and Environmental Engineering
Slovak University of Technology in Bratislava

PROCEEDINGS

42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering

Hotel Hutník
Tatranské Matliare, Slovakia
May 25–29, 2015

Editor: prof. Jozef Markoš

ISBN: 978-80-89475-14-8, EAN: 9788089475148

Nowicka, E., Machnicka, A.: Confirmation of effectiveness surplus activated sludge dry ice disruption by infrared wave analysis, Editor: Markoš, J., In *Proceedings of the 42nd International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranské Matliare, Slovakia, 531–551, 2015.

Confirmation of effectiveness surplus activated sludge dry ice disruption by infrared wave analysis

[a]Nowicka Ewelina, [a]Machnicka Alicja

[a] *University of Bielsko-Biala, Institute of Environmental Protection and Engineering, Department of Microbiology and Environmental Biotechnology, Willowa 2 Str., 43-309 Bielsko-Biala, Poland,*

Corresponding author: master of Science, Nowicka Ewelina; email: enowicka@ath.bielsko.pl; phone: +48 33 827 91 57, Willowa 2 Str., 43-309 Bielsko-Biala, Poland,

Received []

The effectiveness of surplus activated sludge disruption was characterized using biochemical parameters such as SCOD, degree of disintegration, proteins, carbohydrates, RNA acid, ammonia nitrogen, phosphates, turbidity in the liquid phase. The confirmation of the release effect of organic and inorganic matter from microorganisms cells were infrared analysis. Sludge freezing/thawing by dry ice resulted in an SCOD increase of about 826 mg O_2 L^{-1}, and the degree of disintegration (SD_{SCOD}) was 48%. Protein concentrations for the volume ratio of dry ice to precipitate amounting to 1 : 1 increased by 235 mg L^{-1}, the concentrations of carbohydrates increased from 12 mg L^{-1} to 83 mg L^{-1}, the concentration of ammonia nitrogen increased from 0.9 mg N - NH_4^+ L^{-1} to 24 mg of N - NH_4^+ L^{-1}, and the phosphates concentration increased from 4.8 mg PO_4^{3-} L^{-1} to 133 mg PO_4^{3-} L^{-1}. RNA acid concentration in the liquid phase increased by 2.23 mg L^{-1}.

The destruction of surplus activated sludge by dry ice has contributed to the increase of turbidity in the liquid phase - from 57 mg SiO_2 L^{-1} to 410 mg SiO_2 L^{-1}. Additionally, the destructive action of freezing/thawing on surplus activated sludge was confirmed by scanning electron microscope observations.

The effectiveness of surplus activated sludge disintegration was tested in the infrared spectrum. Changes in absorbance at the specified wavelength attest to a release of i.e. amines, amino acids, amide groups (proteins), phosphates, etc. during destroy surplus activated

sludge by dry ice. Revealing these chemical groups in over-sludge liquid attests to a destructive influence of dry ice on surplus activated sludge microorganisms and effective cells lysis.

Keywords: dry ice, surplus activated sludge, organic and inorganic matter, infrared wave.

Introduction

In accordance with the guidelines of the European Union, it is aimed to maximally reuse the sewage sludges, both on the stage of recovery of products and minimization of sludges, as well as final management. Agricultural management of sludges is subject to strict regulations and storage requires development of a strategy, which aims to reduce the amount of biodegradable waste (Babatunde & Zhao, 2007).

Disintegrative treatment methods of sewage sludges belong currently to the most dynamically developing technologies. They concern mainly the possibility of reducing the amount of sludges discharged from sewage treatment plants (Zielewicz, 2007) and improvement of susceptibility of the sludge into a biochemical decomposition (Worwąg et al., 2008).

Disintegration is a process of destroying the structure of the sludge (Zhang et al., 2007; Grűbel & Machnicka, 2011; Nowicka et al., 2014), which involves fragmenting of flocs, destruction of cells of microorganisms and releasing organic substances, inorganic substances and extracellular polymers into the liquid phase of the sludge (Bień et al., 2004). Sewage sludges pre – treatment using a variety of disintegration methods, such as mechanical (sonification, hydrodynamic cavitation) (Wett et al., 2010; Grűbel & Machnicka, 2010), chemical (alkalization, ozonation) (Grűbel et al., 2014; Campios et al., 2009), biological (enzymes) (Roman et al., 2006) and thermal (heat pre – treatment, freezing/thawing) (Saktaywin et al., 2005; Xue & Huang, 2007; Jan et al., 2008; Nowicka & Machnicka, 2014).

Launching pre – treatment thermal sludges in previous years aimed at improving the degree of mineralization of sludge as well as its dewatering (Örmeci, 2004). The dewatering of sewage sludges with the use of freezing/thawing takes place through separation of solid and liquid fractions during the formation of ice crystals. It was also found that this mechanism favours transformation of sediment flocs in agglomerates in a more compact and dense form

(Jean et al., 2001). This method is an effective technique in dewatering of sewage sludges, which was pointed out by Vesilind, Wallinmaa and Martel (Vesilind et al., 1991).

Another possibility of sludges treatment in the process of freezing/thawing presented in this article is a method using dry ice. Dry ice transforms the flocs structure into larger agglomerates and reduces bound water (Lee & Hsu, 1994).

Dry ice or solid carbon dioxide is completely natural product. It is produced in the form of granules for compressing gaseous carbon dioxide to liquid form, removing the heat generated by compression, and then rapid expansion. This expansion and rapid evaporation of carbon dioxide gas remaining fluid which cooled to the melting point and freezing in the CO_2 "snow", which takes the form of beads or prills. The dry ice sublimes at –78.5°C and a pressure of 1013.25 hPa (Jeyasekaran et al., 2006). Its heat of sublimation is 573 kJ, which means that it is approximately 3.3 times more effective coolant than water ice (with the same volume). Its specific gravity comprises in the range from 1.2 kg L^{-1} to 1.6 kg L^{-1} and its hardness on the Mohs scale is 2, which corresponds to the hardness of gypsum. It is anhydrous, non – flammable, non – toxic and has no smell or taste. It is intended as a catering, refrigeration, to clean all types of machines and laboratories to slow exothermic reactions (Franceschini, 2010).

Destructive effects of low temperature on the surplus activated sludge, bind with a group of factors such as rate of freezing and thawing, chemical composition of the environment of microorganisms, species, time of freezing and temperature. However, mechanical destruction of the cells of microorganisms with the use of ice crystals, which rapture them from the inside or damage them from the outside, is put on the first place.

The process by dry ice freezing/thawing of sludges causes the following: destruction of sludge flocs structure, increase of the volume of freezing water in the cytoplasm, mechanical damage to the wall and/or cytoplasmic membranes of microorganisms, osmotic shock, decrease of the stability of secondary structures of RNA and DNA and reduction of the efficiency of transcription, translation, replication of DNA in cells and "cold" death of microorganisms (Libudzisz et al., 2008).

A concentration increase of chemical compounds in the sludge liquid boosts the pool and availability of organic matter for microorganisms taking part in technological processes and thus can be used to improve sewage treatment and sludges pre – treatment.

To confirm the release of various chemical compounds from the cells of microorganisms during the destruction of surplus activated sludge by dry ice, the infrared wave analysis (IR) was applied.

IR technique is absorption spectroscopy used to receive oscillation and rotational spectrum. With the aid of IR spectroscopy, function groups in the analysis sample can be determined. Spectroscopy in the infrared radiation allows for the analysis of molecules structure and their influence on the environment.

Specifically determined range of IR absorption is characteristic for given functional groups of organic compounds. It is extremely rare for two different chemical compounds to have identical spectra in the entire range, which results from their complexity. This unusual complexity of spectra allows for unambiguous identification of compounds (Morris, 1993; Zieliński & Rajca, 2000).

Experimental

Surplus activated sludge samples, from the secondary settling tanks, concentration of suspended solids in average 11.81 g L^{-1}, were taken from municipal wastewater treatment plant in the Silesian voivode ship in Poland, operating according to the Enhanced Biological Nutrient Removal (EBNR) processes. With the goal of phosphorous and nitrogen compounds removal, anaerobic, anoxic and aerobic sectors were distinguished. The plant was designed for a flow of 120 000 m^3 d^{-1}. At present, the amount of treated wastewater is about 90 000 m^3 d^{-1}. Solid retention time (SRT) is about 14 days and concentration of Mixed Liquid Suspended Solid (MLSS) 4320 – 4640 mg L^{-1}.

Disintegration surplus activated sludge by freezing/thawing

Disintegration by freezing/thawing a sample of 1 L^{-1} of surplus activated sludge was executed by dry ice. For disintegration of surplus activated sludge the following volume ratios of the surplus sludge to dry ice were used, ie. 1 : 0.25; 1 : 0.5; 1 : 0.75; 1 : 1.

The time in which samples stay in the frozen state depends on the applied volume of the dry ice:

- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25; 1.5 hours,
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.5; 2 hours,
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.75; 3 hours,
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1; 4.5 hours.

Physicochemical analysis

In the surplus activated sludge samples, before and after the process of disintegration by dry ice, were determined indicative of the release of organic and inorganic matter: soluble chemical oxygen demand (SCOD) value, concentration of proteins, carbohydrates, RNA acid, ammonia nitrogen, phosphates and turbidity value in the liquid phase.

Soluble chemical oxygen demand (SCOD), ammonia nitrogen, phosphates and turbidity value was determined for samples before and after disintegration by dry ice according to for Examination of Water and Wastewater (22^{nd} ed.) (Rice et al., 2012). The proteins concentration was determined by the Lowry methods (Gerhardt et al., 2005). The carbohydrates concentration was determined by the Anthron methods (Tchobanoglous et al., 2002). For the concentration of cellular ribonucleic acid RNA in the surplus activated sludge samples, before and after the process of disintegration by dry ice was determined method from Liwarska-Bizukojc and Ledakowicz (2001) (Liwarska-Bizukojc & Ledakowicz, 2001).

The results here presented were performed 5 times, arithmetic average was calculated. The standard deviation was determined according to the estimator of the highest credibility in STATISTICA 6.0.

The degree of disintegration

In order to obtain a quantitative measure of the effects of disintegration, Kunz and Wagner (Kunz & Wagner, 1994) have proposed a coefficient which they called the degree of disintegration (SD_{SCOD}). Later this coefficient was modified by Müller (Müller, 1996). In this paper the degree of sludge disintegration was determined according to that given by Müller (Müller, 2000) as follows:

$$SD_{SCOD} = [(SCOD_1 - SCOD_2) / (SCOD_3 - SCOD_2)] \cdot 100(\%) \quad (1)$$

where:

SD_{SCOD} is the degree of disintegration,

$SCOD_1$ is the SCOD of the liquid phase of the disintegrated sample,

$SCOD_2$ is the SCOD of the original sample,

$SCOD_3$ is the value after the chemical disintegration.

Chemical disintegration was done in this case by treating the sludge samples for 10 min at 90°C after adding NaOH, 1 M, in a ratio of 1 : 2. Centrifugation in all cases was done for 10 min at 30 000 g.

Microscopy analysis

Biological changes of the sludge were determined on the basis of variations in the structure of the surplus activated sludge flocs using an electron scanning microscope with a rengenographic adapter of energy disperse (EDX – Energy Dispersive analysis of X – rays attachment). In this microscope, a strongly focused electron beam passes through following layers of the object. Emitted electrons are focused by the collector, which controls the electron beam running synchronously in the electron tube. This beam catches the luminescent screen and produces a magnified image of the object, and the EDX adapter enables the study of chemical structure of an object of interest.

Infrared waves

The confirmation of physicochemical changes and release of cellular matter as a result of cellular lysis was a spectroscopy research conducted with the aid of a Nicolet (Madison, WI, USA) Magna – IR 860 spectrometer. The analysis of IR was carried out for samples of supernatant disposed of suspension in the process of excessive and disintegrated surplus activated sludge filtration. The samples of evaporated surplus activated sludge were heated in the temperature of 105°C before the research in order to remove water from them. Spectra were created for samples which proportional amount of sludge was drawn from and blended with sodium chlorate. The spectra of samples obtained by this method were compared in the scope of absorbance proportionally to the amount of the drawn sample, which allowed for quantitative interpretation of the results.

Results and discussion

Disintegration of surplus activated sludge by dry ice caused the release of organic matter (expressed as SCOD) to a liquid phase of the sludge. Changes in SCOD were associated with the disruption of the surplus activated sludge flocs and cells of microorganisms, which led to the release of organic compounds to the sludge liquid.

During the surplus activated sludge disintegration by dry ice, the intensification of increase of SCOD was indicated, depending on the applied volume ratio of sludge to dry ice. Disintegration by dry ice for the volume ratio of the sludge to dry ice 1: 0.25 contributed to the increase of SCOD from the initial value of 63 mg O_2 L^{-1} (raw sludge) to 205 mg O_2 L^{-1}

(Fig. 1) and by increasing the dose of dry ice in relation to the sludge in a ratio of 1 : 1, SCOD achieved the value of 889 mg O_2 L^{-1} (Fig. 1).

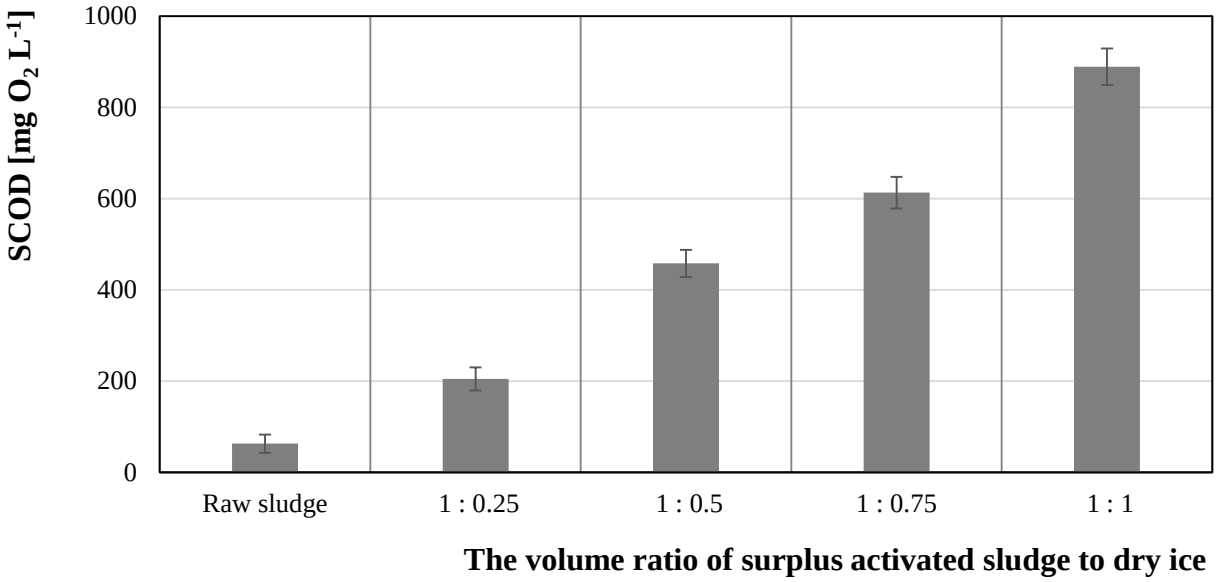


Fig. 1. Changes SCOD value before and after disintegration sludge by dry ice.

In 2014 (Chen et al., 2014) in China, the effectiveness of freezing/thawing of sludges was studied in order to increase degradation of organic substances to the benefit of growth in biogas production and the use of microbiological substrate in the fuel cell (MFC) to produce electric energy. The obtained results demonstrated that a long time of sludge freezing (more than 48 hours) resulted in release of substrate which is susceptible to biochemical degradation process and provided the possibility of its processing into electric energy. The removal efficiency of total SCOD was increased from 25.3% (raw sludge as substrate) to 66.2% and the maximum power output was increased from 8.9 (raw sludge as substrate) to 10.2 W m^{-3} in MFC.

The crystallization of intra – aggregate moisture was claimed to damage cell membranes so to release intracellular substances to the surroundings. Release of organic matter in the process of freezing was examined by Hu et al. (Hu et al., 2004). They obtained more than 15% increase SCOD value.

Wang et al. (Wang et al., 1999) compared the effects of thermal sonolysis with the effects of freezing in –10°C temperature and sonification. They found that the increase of the dissolved SCOD was higher for 40 minutes of sonification and freezing to –10°C temperature, while only sonification appeared to be ineffective. Therefore, it can be assumed that

freezing/thawing of sludge has a significant impact on the introduction of organic matter to a solution.

As expected, with the increase of the dose of the solid carbon dioxide CO_2 in relation to the sludge, the disintegration degree of samples (SD_{SCOD}) increased, which was calculated according to the equation (1).

As a result of destructive effects of dry ice to the sludge structure for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25, the degree of disintegration SD_{SCOD} was 15% (Fig. 2). A further increase of the volume of dry ice doses in relation to the sludge (the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.5; 1 : 0.75; 1 : 1) resulted in the increase in the degree of disintegration (SD_{SCOD}) to 48% (Fig. 2).

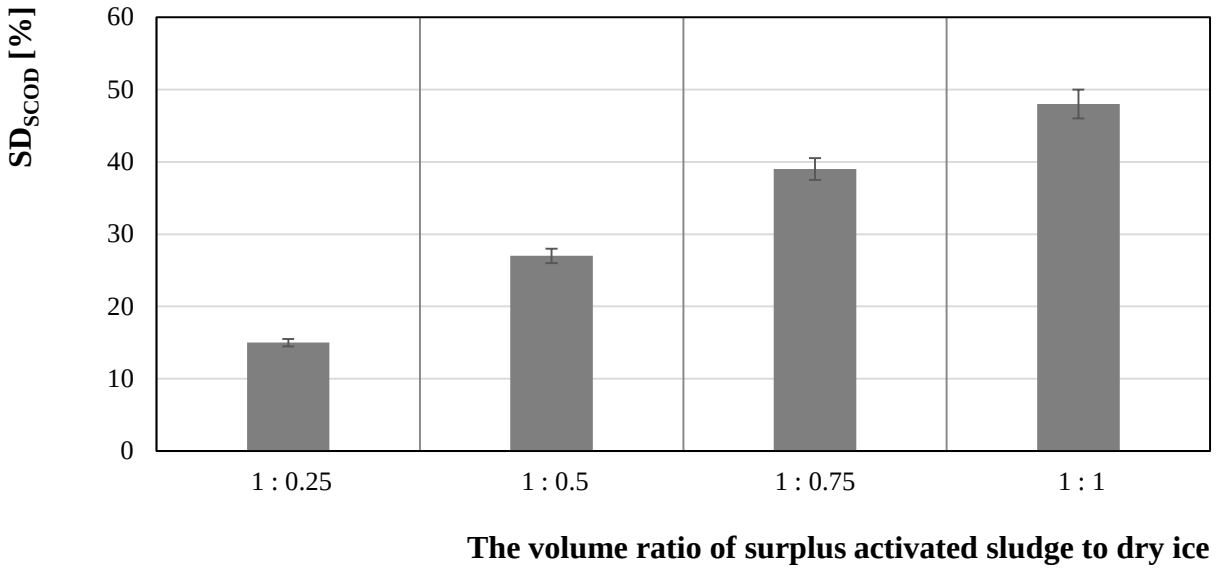


Fig. 2. Degree of disintegration surplus activated sludge by dry ice.

A significant release of proteins was analogous to the increase in the value of SCOD. The increase in proteins concentration was related to the destructive effect of low temperatures on the cells of microorganisms and introducing enzymes and structural proteins to the solution (Örmeci & Vesilind, 2001).

To demonstrate the impact of dry ice to the release of proteins from the cells of the microorganisms, a method designed for determining proteins concentrations, which is successfully used by other authors (Zaia et al., 2000). At the destruction of sludge in the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25, the proteins concentration in the liquid phase of sludge increased from 56 mg L^{-1} (raw sludge) to 99 mg L^{-1} (Fig. 3). A further increase of

sludge to dry ice ration (the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.5; 1 : 0.75; 1 : 1) caused progressive increase of proteins concentration in the solution to 291 mg L^{-1} (Fig. 3).

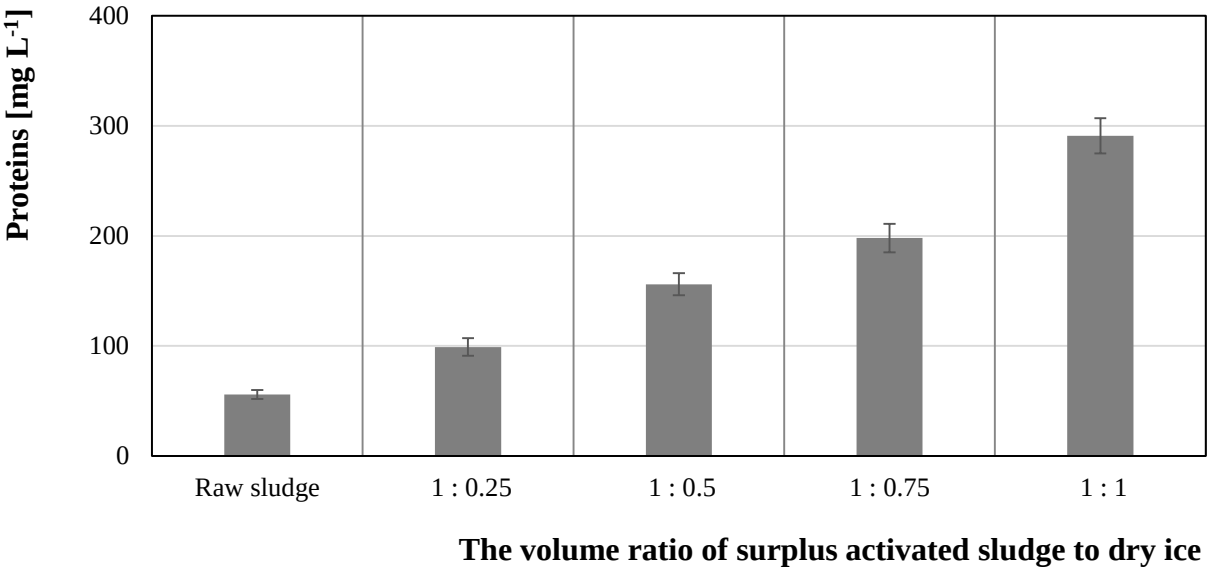


Fig. 3. Changes proteins concentration before and after disintegration sludge by dry ice.

The effectiveness of the process of freezing/thawing of sludge has been expressed by the concentration of carbohydrates in the liquid phase of the sludge. Disintegration of the surplus activated sludge by dry ice led to an increase of carbohydrates concentration in the supernatant, from the initial value of 12 mg L^{-1} for raw sludge to the value of 83 mg L^{-1} for the volume ratio of sludge to dry ice of 1 : 1 (Fig. 4).

Thus, disruption of sludge flocs and cells of microorganisms by disintegration by dry ice, resulted in release of organic matter to the liquid sludge phase, expressed in the increase of the SCOD value, concentration of proteins and carbohydrates (Figs. 1, 3 i 4).

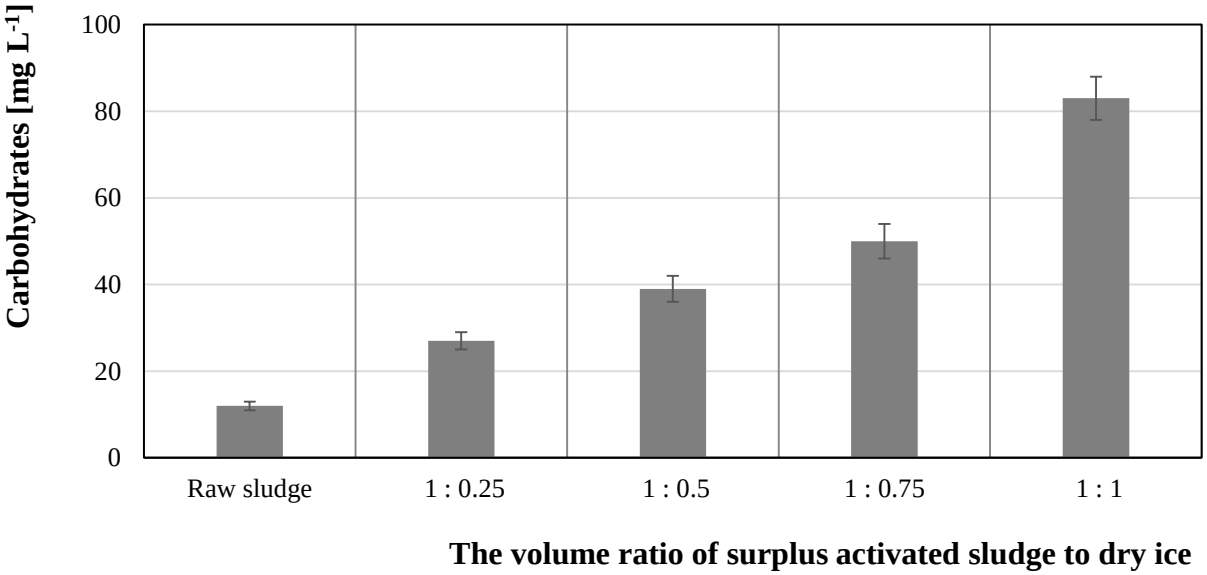


Fig. 4. Changes carbohydrates concentration before and after disintegration sludge by dry ice.

Determining the origin of chemical compounds components of biomass in a liquid sewage sludge phase is difficult and impossible. Therefore, a compound which confirms destruction of organisms, including also cells of microorganisms is to find the presence of RNA ribonucleic acid in the liquid of the sludge.

In the last decade, a number of researchers used the Schneiders method with the use of hot perchlorid acid to determine the RNA or DNA concentration in a medium (Nielsen et al., 1990). Another method used in the studies is a technique which uses cold $HClO_4$ and DR LANGE Xion 500 spectrophotometer (Liwarska-Bizukojc & Ledakowicz, 2001).

Based on the conducted analysis on the effective action of dry ice on the microorganisms of the surplus activated sludge, it has also been found out that the increase of the dose of dry ice in relation to the sludge was followed by an increase of the concentration of RNA acid in the liquid of sludge samples. For the control sample (raw sludge), the concentration of RNA acid amounted to 10.07 mg L^{-1}, while for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1 the concentration of RNA acid increased by 2.23 mg L^{-1} (Fig. 5).

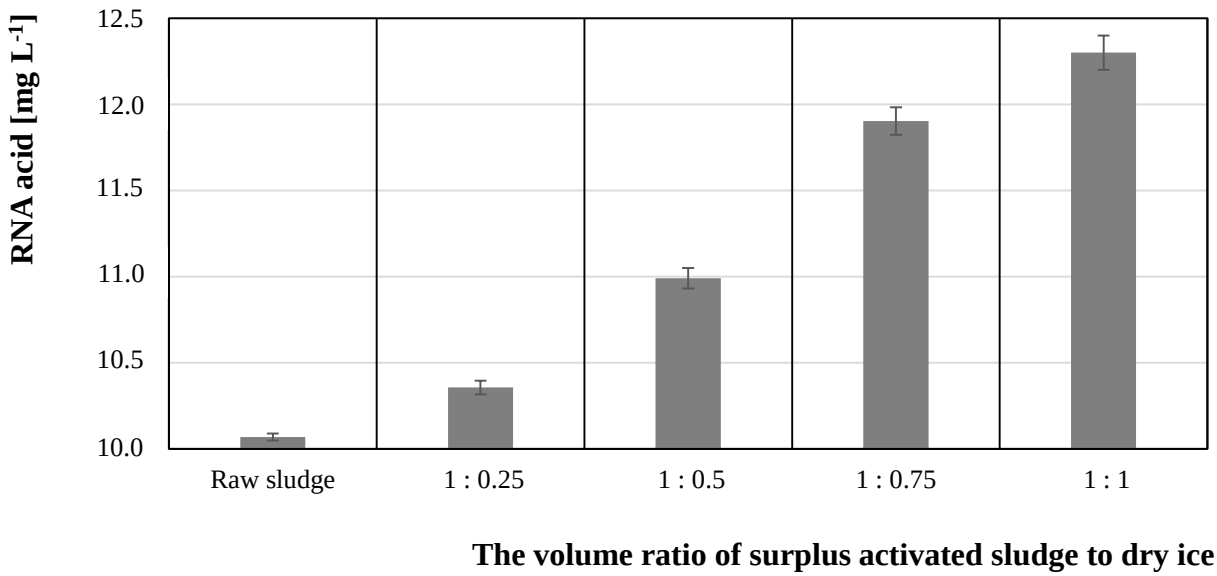


Fig. 5. Changes RNA acid concentration before and after disintegration sludge by dry ice.

As a result of destruction of cells structure of microorganisms by dry ice, the release of enzymes contained in the protoplast of microorganisms took place, whose effect of hydrolytic action was decomposition of nitrogen and phosphorous organic compounds and thus the increase of concentrations of ammonium nitrogen and phosphates in liquid.

The dry ice action on the sludge resulted in gradual increase of ammonium nitrogen concentration in liquid and at the volume rate of sludge to dry ice of 1 : 1, the N – NH_4^+ concentration amounted to 24 mg N – NH_4^+ L^{-1} (Fig. 6).

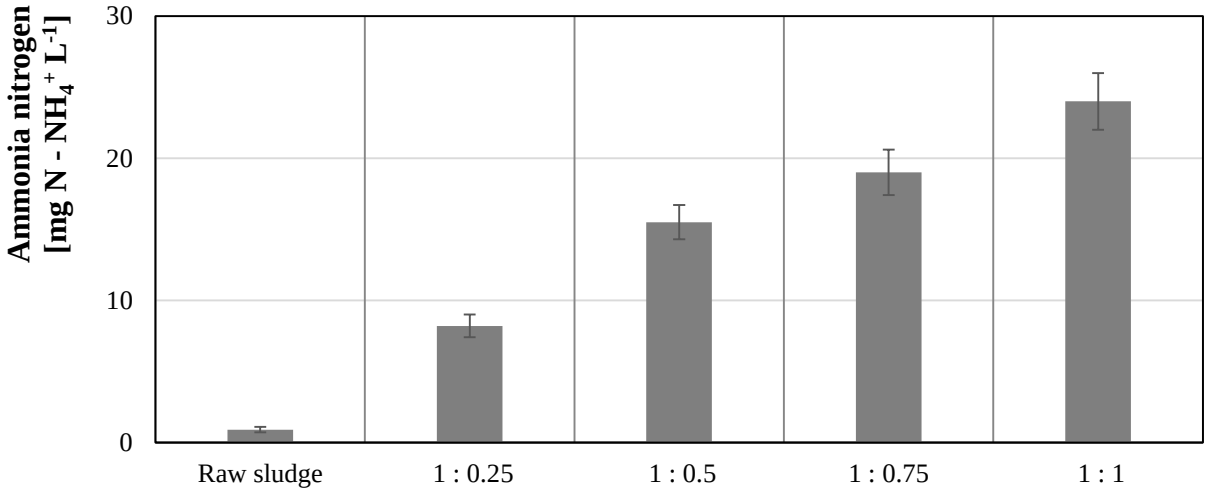


Fig. 6. Changes ammonium nitrogen concentration before and after disintegration sludge by dry ice.

The process of freezing/thawing of surplus activated sludge by dry ice contributed to the increase of concentration of phosphates with an initial value of 4.8 mg PO_4^{3-} L^{-1} (raw sludge) to 133 mg PO_4^{3-} L^{-1} (the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1) (Fig. 7).

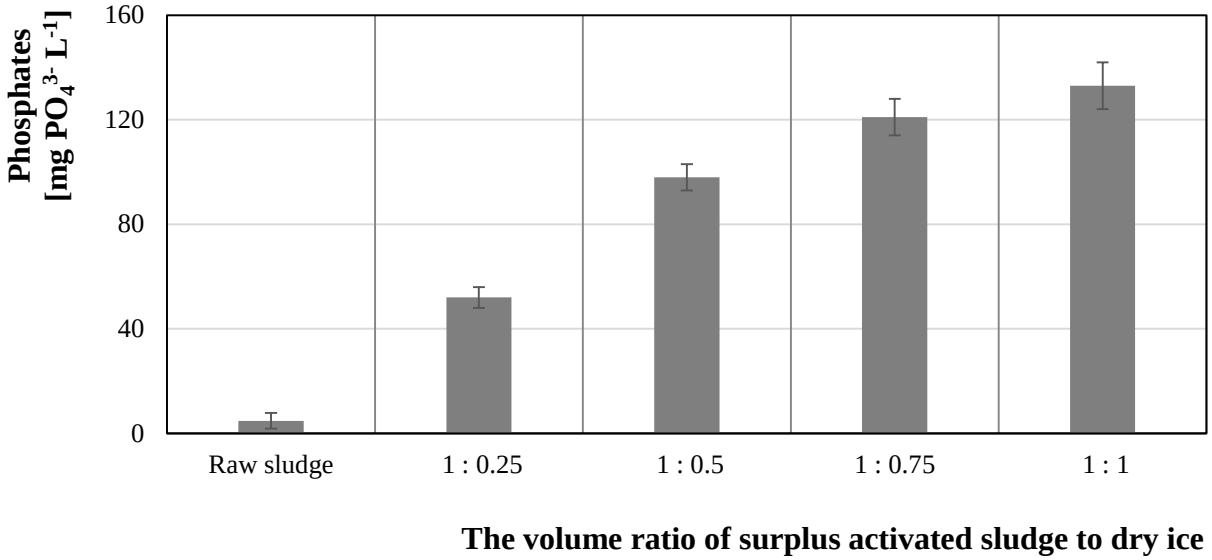


Fig. 7. Changes phosphates concentration before and after disintegration sludge by dry ice.

In 2011, Gao (Gao, 2011) conducted laboratory tests of pre – treatment of sewage sludges, comparing freezing/thawing (–18°C) of sewage sludges with chemical methods (acidification: pH 5.5, alkalization: pH 11.0) and thermal (60°C). He showed that freezing of sewage sludges is an effective method in the treatment process, which resulted in 8 – fold increase of SCOD and ammonia nitrogen, and 2.5 – fold increase of phosphates.

Montusiewicz et al. (Montusiewicz et al., 2010) evaluated the effect of disintegration of sludges via (using variable temperature) freezing/thawing on the properties of mixed sludge (primary and waste) from municipal wastewater treatment plant. They examine the effects of the process of freezing/thawing on the quality of supernatant. The effect of freezing caused a 10% increase of concentration of nitrogen and phosphate compounds, which corresponds with the results obtained to some extent.

Disintegration of surplus activated sludge by dry ice led to an increase of turbidity of supernatant, which was caused by adding the suspension load and organic and inorganic

colloids to the solution. The turbidity increased from the initial value of 57 mg SiO_2 L^{-1} for a raw sludge to the value of 410 mg SiO_2 L^{-1} for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1 (Fig. 8). Its changes were dependent on the volume ratio of sludge to dry ice which was applied (Fig. 8).

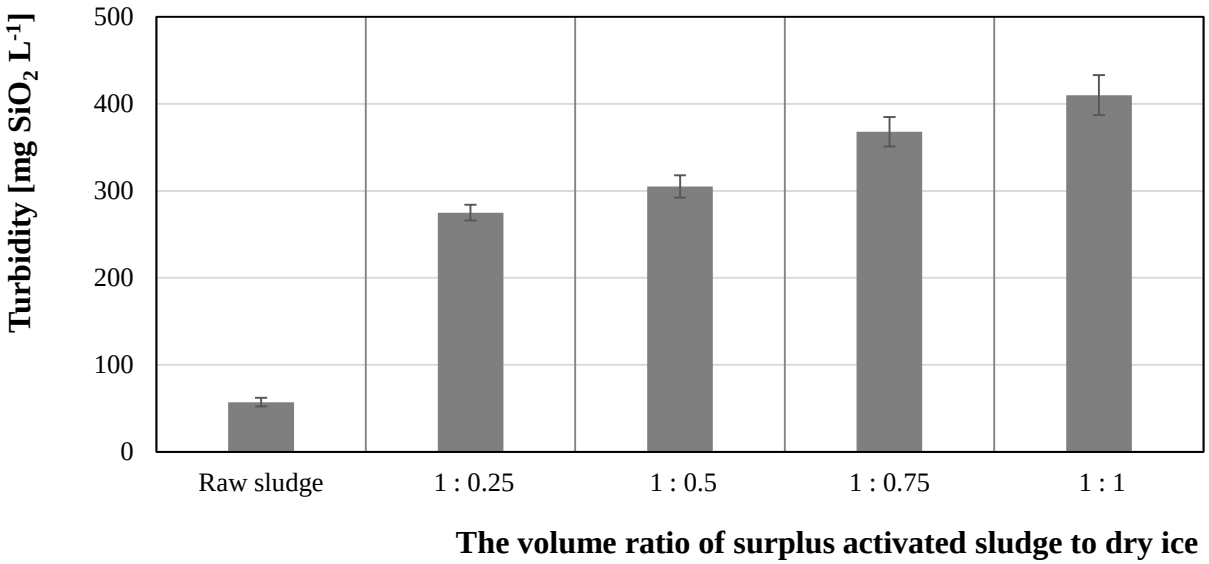


Fig. 8. Changes the turbidity in the liquid phase before and after disintegration sludge by dry ice.

Confirmation of physicochemical results obtained were microscopy analysis with the use of the electron scanning microscope, which were carried out.

In order to maximise the release of organic and inorganic substance from the cells of microorganisms, it is aimed to obtain the particles of possibly the smallest sizes in disintegration processes. The literature, the size of 1.0 mm (Wolny & Kamizela, 2003) is mentioned.

Under laboratory conditions, due to performed thermal disintegration of microorganisms of surplus activated sludge, a variable particle size has been obtained, however, not greater than 0.4 mm. The structure of the obtained mixture and sizes of particles achieved, for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, is presented on Fig. 9.

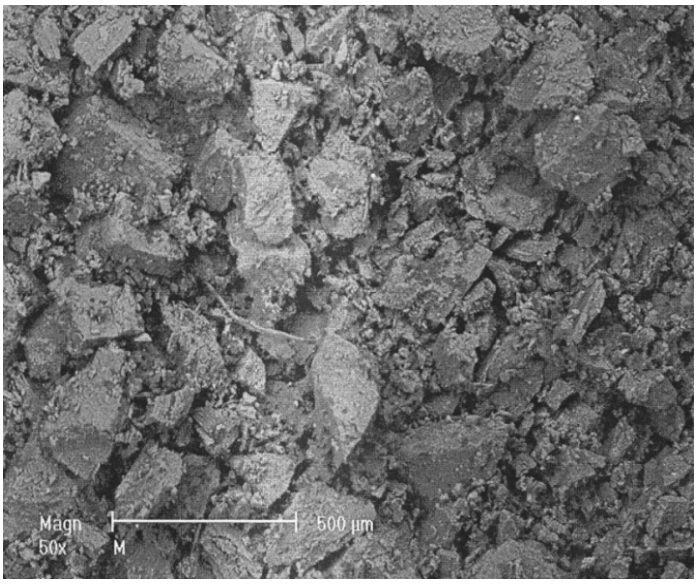


Fig. 9. Disintegrated surplus activated sludge (the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1) – a picture from the electron scanning microscope.

Changes in the values of chemical parameters of liquid involved in the surplus activated sludge depended on the volume ratio of sludge to dry ice which was applied. Following the increase in the volume of dry ice dose to sludge, greater changes in designated concentrations appeared. Considering influence of the process of freezing/thawing, it was found out that changes in chemical properties appeared in the samples due to the lysis of cells and release of enzymes. The use of thermal phenomena caused physicochemical reactions that have influenced the nature of distribution of substances present in the solution (of surrounding liquid). Consequently, this led to release of organic and inorganic substances and intracellular enzymes, as well as extracellular enzymes appearing in connections with colloid substances.

The confirmation of physicochemical changes and release of cellular matter as a result of cellular lysis was a spectroscopy research conducted with the aid of Nicolet Magna-IR 860 spectrophotometer. The research results obtained confirm an increase of released and dissolved intracellular substances (Fig. 10).

An increase in absorbance may be observed at individual wavelengths characteristic for oscillators of chemical groups along with the extension of the volume ratio of surplus activated sludge to dry ice. An increase in the field under the peak at wavelength ca. 3400 cm^{-1} attests to an increase in concentration of oscillators of tensile vibration O – H and N – H (Fig. 10). However, an increase in absorbance at wavelength ca. 2350 cm^{-1}, ca. 2950 cm^{-1} and 1400 cm^{-1} attests to an increase in concentration of oscillators respectively S – H and C – H

(Fig. 10). Moreover, an increase in fields under bands at wavelength 1650 cm^{-1} attests to an increase in concentration of C = O vibration oscillators in amides. However, a change in absorbance at wavelength ca. 1100 cm^{-1} corresponds with an increase in concentration of C – O, P – O and S – O vibration oscillators which occur (build) in cells and their absorption bands interfere in this spectrum range (Fig. 10) (Socrates, 2004).

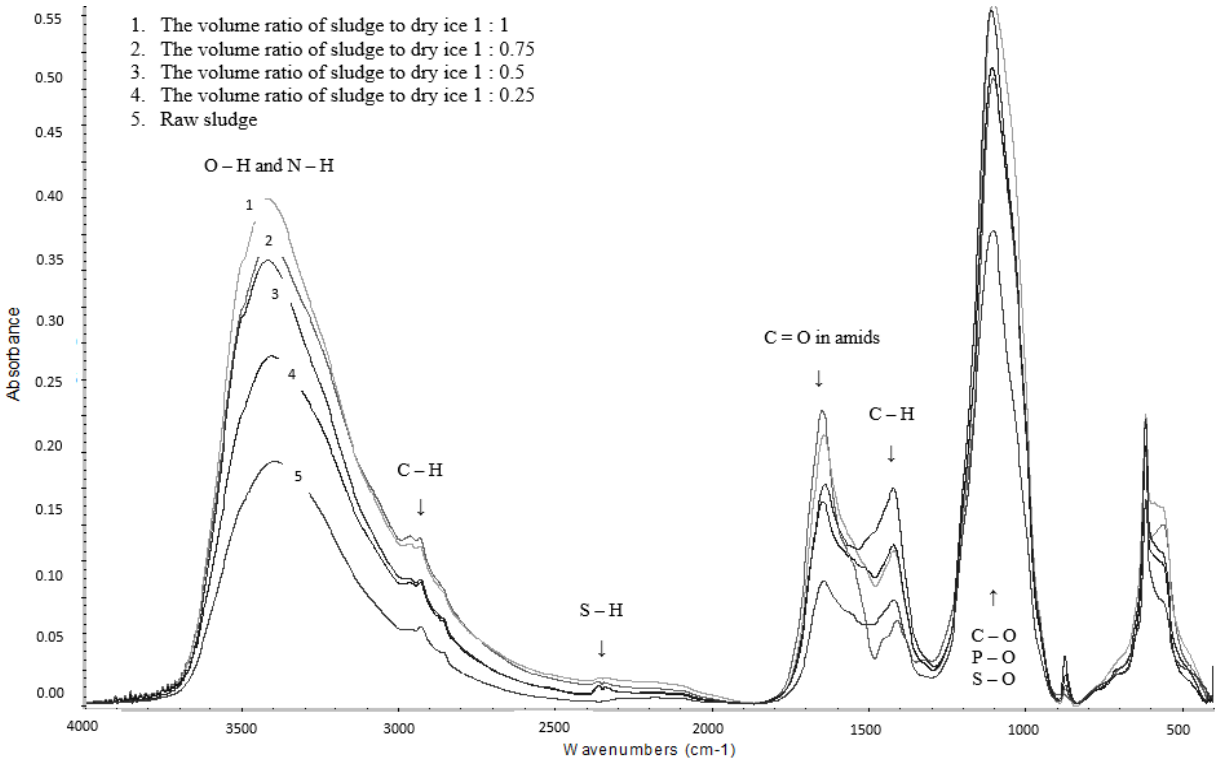


Fig. 10. Individual wavelengths characteristic for oscillators of chemical groups for freezing/thawing surplus activated sludge disintegration.

Changes in absorbance at the wavelength mentioned attest to a release of i.e. amines, amino acids, amide groups (proteins), phosphates, etc. Revealing these chemical groups in over – sludge liquid attests to a destructive influence of freezing/thawing on surplus activated sludge microorganisms and effective cellular lysis. The results obtained also confirm changes in SCOD value in over-sludge liquid presented previously and changes in concentration of phosphates, ammonia nitrogen or proteins.

Moreover, proportionally lesser absorbance increment at a volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25 than 1 : 1. It may attest to a beginning homogenization process of disintegrated medium (ratio, sludge to dry ice 1 : 0.25) and only increasing of disintegration (ratio, sludge to dry ice 1 : 1).

The impact of the process of freezing by dry ice/thawing of sewage sludges on the increase of concentrations of organic and inorganic matter, determined by spectroscopic analysis, were confirmed with the IR analysis, which corresponds with the results obtained by Hu et al. (Hu et al., 2011).

Conclusions

1. Disintegration of surplus activated sludge by dry ice caused the release of organic matter expressed in the SCOD value. The greater was the dose of dry ice in relation to the sludge, the higher was the value of SCOD in a liquid phase. In a liquid phase of sludge which has not been subject to disintegration, the value of SCOD amounted to 63 mg O_2 L^{-1}, and upon disintegration by dry ice for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, the SCOD value increased to 889 mg O_2 L^{-1}.
2. Following the increase of dose of dry ice, the degree of disintegration SD_{SCOD} increased and for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1 reached 48%.
3. As a result of disintegration of surplus activated sludge by dry ice, a destruction of cellular structures of microorganisms appeared, and thus there was an increase in proteins and carbohydrates concentration in the sludge liquid. In the liquid phase of raw sludge, the concentration of proteins amounted to 56 mg L^{-1}, while carbohydrates concentration was at the level of 12 mg L^{-1}. After disintegration by dry ice in the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, proteins concentration increased by 235 mg L^{-1} and carbohydrates concentration by 71 mg L^{-1}.
4. The destruction of surplus activated sludge by dry ice which was carried out, contributed to destruction of microorganisms and at the same time the release of RNA acid to the sludge liquid phase. The RNA concentration increased by 2.23 mg L^{-1} for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1.
5. Dry ice caused the release of inorganic compounds from the surplus activated sludge being subject to disintegration. In the surplus activated sludge which has not been subject to disintegration, ammonia nitrogen concentration amounted to 0.9 mg N – NH_4^+ L^{-1} and after destruction of the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, the N – NH_4^+ concentration increased to 24 mg L^{-1}. In the surplus activated sludge which has not been subject to disintegration by dry ice, phosphates concentration was at 4.8 mg

PO_4^{3-} L^{-1} level, while upon freezing by dry ice/thawing for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, the phosphates concentration increased by 128.2 mg PO_4^{3-} L^{-1}.

6. Disintegration of surplus activated sludge by dry ice caused an increase in the turbidity of supernatant. For the surplus activated sludge which has not been subject to disintegration by dry ice, the liquid turbidity expressed in mg SiO_2 L^{-1} amounted to 57, while after disintegration by dry ice for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, the turbidity increased by 353 mg SiO_2 L^{-1}.
7. The changes in absorbance at these wavelengths indicate the release during disintegration by dry ice of among others, amines, amino acids, amide groups (proteins), phosphates, etc. The separation of supernatant of those chemical groups testifies the destructive action of dry ice on microorganisms of the surplus activated sludge and effective lysis of cells of microorganisms.

Acknowledgements

This work was supported by the EU project POKL04.01.02-00-196/09-00 "Building engineering - a bridge between tradition and modernity region".

Symbols

Subscripts

CO_2	solid carbon dioxide
EBNR	enhanced biological nutrient removal processes
SRT	solid retention time
MLSS	mixed liquid suspended solid
SCOD	soluble chemical oxygen demand
SD_{SCOD}	degree of disintegration
EDX	Energy Dispersive analysis of X – rays attachment
IR	infrared waves
MFC	microbial fuel cell
RNA	ribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid

References

Babatunde, A. O., & Zhao, Y. Q. (2007). Constructive Approaches Toward Water Treatment Works Sludge Management: An International Review of Beneficial Reuses. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 37,* 12-164. DOI: 10.1080/10643380600776239.

Bień, J. B., Malina, G., Bień J. D. & Wolny L. (2004). Enhancing anaerobic fermentation of sewage sludge for increasing biogas production. *Journal of Environmental Science and Health, Part A. 39,* 939-949. DOI: 10.1081/ESE-120028404.

Campios, J. L., Otero, L., Franco, A., Mosquera-Corral, A., & Roca E. (2009). Ozonation strategies to reduce sludge production of a seafood industry WWTP. *Bioresource Technology, 100,* 1069-1073. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.07.056.

Chen, Y., Jiang, J., & Zhao Q. (2014). Freezing/thawing effect on sewage sludge degradation and electricity generation in microbial fuel cell. *Water Science Technology, 70,* 444-9. DOI: 10.2166/wst.2014.226.

Franceschini, O. (2010). *Dewatering of sludge by freezing.* Ph.D. thesis, University of Technology, Luleå.

Gao W. (2011). Freezing as a combined wastewater sludge pretreatment and conditioning method. *Desalination, 268,* 170-173. DOI: 10.1016/j.desal.2010.10.014.

Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., & Krieg, N. R. (2005). Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology,* Washington.

Grűbel, K., & Machnicka A. (2011). Oddziaływanie dezintegracji mikrofalowej na osad czynny. *Proceedings of ECOpole, 5*, 217-222.

Grűbel, K., & Machnicka A. (2010). Hydrodynamic disintegration of foam biomass to upgrade of wastewater. *Ecological Chemistry and Engineering S, 17,* 137 – 148.

Grűbel, K., Machnicka, A., Nowicka, E., & Wacławek S. (2014). Mesophilic-thermophilic fermentation process of waste activated sludge after hybrid disintegration. *Ecological Chemistry and Engineering S, 1,* 125-136. DOI: 10.2478/eces-2014-0011.

Hu, K., Jiang, J. Q., Zhao, Q. L., Lee, D. J., Wang, K., & Qiu, W. (2011). Conditioning of wastewater sludge freezing and thawing: Role of curing. *Water Research,* 45, 5969-5976. DOI: 10.1016/j.watres.2011.08.064.

Hu, J. H., Johnston, K. P., & Williams, R. O. (2004). Rapid dissolving high potency danazol powders produced by spray freezing into liquid process. *International Journal of Pharmaceutics, 271,* 145–154. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.11.003.

Jan, T. W., Adav, S. S., Lee, D. J., Wu, R. M., Su, A., & Tay, J. H. (2008). Hydrogen fermentation and methane production from sludge with pretreatments. *Energy Fuels, 22,* 98-102. DOI: 10.1021/ef700278j.

Jean, D. S., Lee, D. J., & Chang, C. Y. (2001). Direct sludge freezing using dry ice. *Advances in Environmental Research, 5,* 145-50. DOI: 10.1016/S1093-0191(00)00052-6.

Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Anandaraj, R., Jeya Shakila, R., & Sukumar, D. (2006). Quantitative and qualitative studies on the bacteriological quality of Indian white shrimp (*Penaeus indicus*) stored in dry ice. *Food Microbiology, 23,* 526-533. DOI: 10.1016/j.fm.2005.09.009.

Kunz, P., & Wagner, S. (1994). Results and outlooks of investigations of sewage sludge disintegration – Ergebnisse und Perspektive aus Untersuchungen zur Klärschlammdesintegration. *Heft 1: AWT Abwassertechnik.*

Lee, D. J., & Hsu Y. H. (1994). Fast freeze/thaw treatment on excess activated sludges: floc structure and sludge dewaterability. *Environmental Science Technology, 28,* 1444-1449. DOI: 10.1021/es00057a011.

Libudzisz, Z., Kowal, J., & Żakowska, Z. (2008). *Mikrobiologia techniczna*, Warszawa: PWN.

Liwarska-Bizukojc, E., & Ledakowicz, S. (2001). RNA assay as a method of viable biomass determination in the organic fraction of municipal solid waste suspension. *Biotechnology Letters, 23,* 1057-1060.

Montusiewicz, A., Lebiocka, M., Rożej, A., Zacharska, E., & Pawłowski, L. (2010). Freezing/thawing effects on anaerobic digestion of mixed sewage sludge. *Bioresource Technology,101,* 3466-3473. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.125.

Morris, M.D., (1993). Ed. *Microscopic and Spectroscopic Imaging of the Chemical State*. NewYork: Marcel Dekker, Basel, Hong-Kong,.

Müller, J. (2000). Disintegration as key-stop in sewage sludge treatment. *Water Science Technology, 41,* 123-139.

Müller, J. (1996). Mechanical disintegration of sewage sludge – Mechanischer Klärschlammaufschluß, Schriftenereihe ”Berichte aus der Verfahrenstechnik” der Fakultät für Maschinenbau und Elektrotechnik der Universität Braunschweig. Germany: Shaker Verlag, Aachen.

Nielsen, J., Nikolajsen, K., & Villadsen, J. (1990). Application of flow-injection analysis the on-line monitoring of sugars, lactic, acid, protein and biomass during lactic acid fermentations. *Analitica Chimica Acta, 237,* 165-175.

Nowicka, E., Machnicka, A., & Grűbel, K. (2014). Improving of anaerobic digestion by dry ice disintegration of activated sludge. *Ecological Chemistry and Engineering A, 21,* 211-219. DOI: 10.2428/ecea.2014.21(2)17.

Nowicka, E., & Machnicka, A. (2014). Hygienization of surplus activated sludge by dry ice. *Ecological Chemistry and Engineering S, 21,* 651-660. DOI: 10.1515/eces-2014-0047.

Örmeci, B., & Vesilind, P. A. (2001). Effect of dissolved organic material and cations on freeze-thaw conditioning of activated and alum sludges. *Water Research, 35,* 4299-4306. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00174-9.

Örmeci, B. (2004). Freeze-Thaw conditioning of activated sludge: effect of monovalent, divalent, and trivalent cations. *Journal of Residuals Science & Technology, 1,* 143-150. DOI: 1544-8053/04/03 143-08.

Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., & Clesceri, L. S. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (22nd edition),* Washington: American Public Health Association.

Roman, H. J., Burgess, J. E., & Pletschke B. I. (2006). Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. *African Journal Biotechnology, 5,* 963-967.

Saktaywin, W., Tsuno, H., Nagare, H., Soyama, T., & Weerapakkaroon, J. (2005). Advanced sewage treatment process with excess sludge reduction and phosphorus recovery. *Water Research, 39,* 902-910. DOI: 10.1016/j.watres.2004.11.035.

Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts. 3rd edition*. England: John Wiley & Sons LTD

Tchobanoglous, G., Burton, F. L., & Stensel, H. D. (2002). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse (4th edition).* Metcalf & Eddy, Inc.

Vesilind, P. A., Wallinmaa, S., & Martel, C. J. (1991). Freeze-thaw sludge conditioning and double layer compression. *Canadian Journal of Civil Engineering, 18,* 1078-1083. DOI: 10.1139/l91-130.

Wang, Q., Kuninobu, M., Kakimoto, K., Ogawa, H., & Kato, Y. (1999). Upgrading of anaerobic digestion of waste activated sludge by ultrasonic pretreatment. *Bioresource Technology, 68,* 309-313. DOI: 10.1016/S0960-8524(98)00155-2.

Wett, B., Phothilangka, P., & Eladawy, A. (2010). Systematic comparison of mechanical and thermal sludge disintegration technologies. *Waste Management, 30,* 1057-1062. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.12.011.

Wolny, L., & Kamizela, T. (2003). Technika dezintegracji ultradźwiękowej w technologii ścieków i osadów ściekowych. *Ekologia i Technika, 11,* 3-7.

Worwąg, M., Brzeska, K., Zawieja, I., & Bień, J. (2008). Stabilizacja beztlenowa osadów ściekowych pochodzących z przemysłu celulozowo-papierniczego. *Proceedings of ECOpole, 2,* 493-498.

Xue, T., & Huang, X. (2007). Releasing characteristics of phosphorus and other substances during thermal treatment of excess sludge. *Journal of Environmental Science, 19,* 1153-1158. DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60188-0.

Zaia, D. A. M, Verri. Jr. A. A, & Zamia, C. T. B. V. (2000). Determination of total proteins in several tissues of rat: a comparative study among spectrophotometric methods. *Microchemical Journal, 64,* 235-239. DOI: 10.1016/S0026-265X(00)00017-5.

Zhang, G., Zhang, P., Yang, J., & Chen, Y. (2007). Ultrasonic reduction of excess sludge from the activated sludge system. *Journal of Hazardous Materials, 145,* 515-519. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.01.133.

Zielewicz, E. (2007). *Dezintegracja ultradźwiękowa osadu nadmiernego w pozyskiwaniu lotnych kwasów tłuszczowych.* Gliwice: Politechnika Śląska. Zeszyty Naukowe.

Zieliński, W., Rajca, A. (2000). Eds. *Spectroscopic methods and their application to identification organic compounds.* Warszawa: Publisher of Science and Technology.

[2A]

Nowicka E., Grűbel K., Machnicka A. (2015) Polepszenie własności grawitacyjnych osadu nadmiernego poddanego wstępnej obróbce. Inżynieria Ekologiczna. 41, 90 – 96. DOI: 10.12912/23920629/1832.

Inżynieria Ekologiczna
Ecological Engineering
Vol. 41, 2015, 90–96
DOI: 10.12912/23920629/1832

POLEPSZENIE WŁASNOŚCI GRAWITACYJNYCH OSADU NADMIERNEGO PODDANEGO WSTĘPNEJ OBRÓBCE

Ewelina Nowicka[1], Klaudiusz Andrzej Grűbel[1], Alicja Machnicka[1]

[1] Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska, Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała, e-mail: enowicka@ath.bielsko.pl; kgrubel@ath.bielsko.pl; amachnicka@ath.bielsko.pl

STRESZCZENIE

Powstawanie osadów ściekowych jest nieuniknioną konsekwencją procesów oczyszczania ścieków, a ich unieszkodliwianie i utylizacja wymaga wiedzy, rozwiązań technologicznych i technicznych. Zastosowanie procesów wstępnej obróbki/kondycjonowania pozwala na uzyskanie poprawy własności mechanicznych osadów ściekowych. W ostatniej dekadzie można odnotować wiele prac badawczych z całego świata skoncentrowanych na nowych metodach kondycjonowania osadów tj. procesach dezintegracji, wśród których stosuje się destrukcję mechaniczną, chemiczną i biologiczną. Pomimo odmiennego działania każdej z metod (wprowadzona energia, zjawiska cieplne, zachodzące reakcje chemiczne, oddziaływania mechaniczne) ich wspólnym celem jest niszczenie struktury kłaczków osadu czynnego oraz mikroorganizmów, co skutkuje zmianami własności osadów i cieczy nadosadowej. W artykule przedstawiono wpływ dezintegracji mikrofalowej i zamrażania/rozmrażania suchym lodem na wybrane własności grawitacyjne osadu czynnego nadmiernego. Określono parametry charakterystyczne dla procesu sedymentacji osadu tj. prędkość opadania i zagęszczania, indeks gęstości osadu i indeks objętości osadu oraz zmiany zachodzące w cieczy nadosadowej. Przeprowadzone badania wykazały skuteczność stosowania wybranych metod dezintegracji osadu w odniesieniu do poprawy właściwości grawitacyjnych i stały się przyczynkiem do określenia skutecznej metodyki wstępnego kondycjonowania osadów.

Słowa kluczowe: fala elektromagnetyczna, suchy lód, osad czynny nadmierny, własności grawitacyjne osadu.

IMPROVING THE GRAVITATIONAL PROPERTIES OF SEWAGE SLUDGE BY PRETREATMENTS

ABSTRACT

The formation of sludge is an inevitable consequence of wastewater treatment processes. Their disposal and utilization requires knowledge on technology and engineering. The application of pretreatment processes/conditioning allows to obtain better mechanical properties of sludge. In the last decade a lot of research from around the world focused on new methods of conditioning of sludge can be noticed, i.e. The processes of disintegration, of which the destruction of the mechanical, chemical and biological. Despite different activities of each method (introduced energy, thermal phenomena, chemical reactions, mechanical), their common goal is the destruction of activated sludge floc structure and micro-organisms, which result in changes of properties in sediment and supernatant liquid. The influence of the disintegration of the microwave and freezing/thawing dry ice on selected properties of gravitational surplus activated sludge were presented. Characteristic parameters determined sludge sedimentation processes, i.e. the rate of descent and compaction density index sediment and sludge volume index and changes in the supernatant liquid. The study showed the efficacy of selected methods of sludge disintegration with regard to improving the properties of gravity and becoming a contribution to the determination of the effective methods of deposits' preconditioning.

Keywords: electromagnetic wave, dry ice, surplus activated sludge, gravitational sludge properties.

WPROWADZENIE

W dobie rozwoju miast i polepszającej się stopy życiowej człowieka pojawia się problem z powstawaniem ogromnych ilości osadów ściekowych, a tym samym problem z ich przeróbką. Zarówno kompleksowość jak i czasochłonność procesów przeróbki osadów ściekowych sprawia, iż spełnienie wymagań związanych z ich zagospodarowaniem wymusza coraz większe nakłady finansowe, niekiedy przekraczające nawet 50% ogólnych kosztów eksploatacyjnych. Poszukuje się więc efektywnych procesów, które pozwoliłyby na zagospodarowanie osadów bezpiecznych dla środowiska oraz ograniczyć narastające koszty [20].

Jednym z zastosowanych rozwiązań są procesy dezintegracji osadów ściekowych. Dezintegracje polegają na niszczeniu struktury osadu jak również na rozerwaniu osłon komórkowych przy pomocy sił zewnętrznych i uwolnieniu substancji organicznych, nieorganicznych jak również wewnątrzkomórkowych polimerów do fazy płynnej osadu [18].

Dezintegracje osadów ściekowych wykorzystuje się do poprawy ich jakości, efektywności procesów rozkładu biologicznego oraz zwiększenia stopnia rozkładu substancji trudno biodegradowalnych. Przyczyniają się również do ograniczenia zjawiska pienienia, puchnięcia osadu w procesach oczyszczania ścieków oraz obniżenia indeksu osadu. Procesy dezintegracyjne doprowadzają do zniszczenia kłaczków i zmniejszenia objętości osadu, a tym samym do zwiększenia udziału cząstek koloidalnych.

Wśród stosowanych i badanych metod dezintegracji wykorzystuje się głównie: ozonowanie [3], alkalizowanie [10], zakwaszanie [24], użycie wysokiego ciśnienia [8], rozdrabnianie mechaniczne [16], enzymy [21], ultradźwięki [25], promieniowanie mikrofalowe [6] oraz zamrażanie/rozmrażanie [15, 19].

Promieniowanie mikrofalowe stanowi składową widma elektromagnetycznego, którego długość fali wynosi od 1 mm do 1 m, co odpowiada częstotliwości od 300 MHz do 300 GHz, która najczęściej wykorzystywana jest w radarach i telewizji satelitarnej czy telefonach komórkowych [26]. Spektrum widma zawarte jest w przedziale pomiędzy promieniowaniem podczerwonym, a falami radiowymi (krótkimi) – jest to zakres odpowiadający częstotliwości od $3 \cdot 10^9$ do $3 \cdot 10^{12}$ Hz, a długości λ od 10^{-4} do 10^{-1} m [12].

Promieniowanie mikrofalowe opiera się na interakcji, jaka zachodzi pomiędzy wzajemnie przenikającymi drganiami elektrycznymi i magnetycznymi. Energia mikrofalowa indukuje ruch cząsteczkowy poprzez rotację dipoli i migrację jonów. Wchłonięte kwanty energii, wzbudzając cząsteczki powodują przejście zawartych w nich elektronów na wyższy poziom energetyczny [13]. Cechą odróżniającą mikrofale od pozostałych składowych widma elektromagnetycznego jest to, iż wywołują ruch molekuł w zmiennym polu elektrycznym w taki sposób, że nie następuje uszkodzenie wytrzymałości (trwałości) wiązań chemicznych, które posiadają większą energię niż energia niesiona przez mikrofale [9].

Zamrażanie/rozmrażanie z wykorzystaniem suchego lodu jest skuteczną techniką dezintegracji stosowaną w odwadnianiu osadów ściekowych na co zwrócił uwagę Vesilind i Martel [17, 23]. Odwadnianie osadów ściekowych za pomocą zamrażania/rozmrażania dokonuje się poprzez wydzielenie frakcji stałych i ciekłych, w trakcie powstawania kryształków lodu. Stwierdzono również, że mechanizm ten sprzyja przekształceniu kłaczków w postać bardziej zwartą, zbitą [4].

Suchy lód to dwutlenek węgla w stanie stałym, który powstaje przy rozprężaniu ciekłego dwutlenku węgla w warunkach normalnych (temperatura 273 K, ciśnienie 1013,25 hPa). Suchy lód sublimuje w temperaturze – 78,5°C i przy ciśnieniu 1013,25 hPa. Jego ciepło sublimacji wynosi 573 kJ, co powoduje, że jest on ok. 3,3 razy efektywniejszym czynnikiem chłodniczym niż lód wodny (przy tej samej objętości). Jego ciężar właściwy mieści się w zakresie od 1,2 kg/dm^3 do 1,6 kg/dm^3, a jego twardość w skali Mohsa wynosi 2, co odpowiada twardości gipsu. Jest bezwodny, niepalny, nietoksyczny oraz nie posiada smaku ani zapachu.

W artykule przedstawiono wpływ dezintegracji mikrofalowej i zamrażania/rozmrażania suchym lodem na wybrane własności grawitacyjne osadu czynnego nadmiernego.

MATERIAŁ I METODA

Materiałem badawczym był osad czynny nadmierny (z osadnika wtórnego) o stężeniu suchej masy – średnio – 11,81 g/dm^3, pochodzący z oczyszczalni ścieków zlokalizowanej na terenie województwa śląskiego, stosującej zintegrowany system biologicznego usuwania związków

organicznych, fosforu i azotu (EBNR) ze ścieków. Usuwanie związków biogennych ze ścieków zachodzi z wykorzystaniem sektorów beztlenowych, anoksycznych i tlenowych. Oczyszczalnia została zaprojektowana dla przepływu ścieków 120 000 m^3/d. Natężenie dopływu ścieków do tej oczyszczalni wynosi ok. 90 000 m^3/d, czas zatrzymania ścieków jest ok. 14-sto dniowy, a stężenie substancji zawieszonej w bioreaktorze znajduje się w przedziale 4,32–4,64 g/dm^3.

WSTĘPNA OBRÓBKA OSADU CZYNNEGO NADMIERNEGO

Dezintegracja mikrofalowa

Proces dezintegracji osadu czynnego nadmiernego (próbka o objętości 500 cm^3) przeprowadzono przy użyciu fali elektromagnetycznej (mikrofal) o częstotliwości 2,45 GHz i mocy 900 W. Czas ekspozycji osadu czynnego nadmiernego na promieniowanie mikrofalowe wynosił: 120 s, 180 s, 240 s i 300 s.

Dezintegracja termiczna suchym lodem

Do dezintegracji osadu czynnego nadmiernego (próbka o objętości 500 cm^3) suchym lodem zastosowano następujące stosunki objętościowe osadu do suchego lodu, tj.: 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1. Osad nadmierny o temperaturze pokojowej wymieszano z określoną powyżej objętością suchego lodu. Następnie próbki poddano rozmrożeniu w temperaturze pokojowej, aż do całkowitego wysublimowania suchego lodu.

Pomiar opadania oraz prędkości zagęszczania osadu

Opadanie osadów obserwowano w cylindrach o pojemności V = 1000 cm^3 i powierzchni przekroju wynoszącej F = 26,4 cm^2. Zakres badań obejmował określenie kinetyki sedymentacji opartej na krzywych opadania osadu i prędkości zagęszczania. Dodatkowo wykonano oznaczenia zmian mętności cieczy nadosadowej, co pozwoliło potwierdzić destrukcję kłaczków i mikroorganizmów osadu czynnego nadmiernego.

W próbkach osadu, zarówno w kontrolnych jak i tych poddanych procesowi dezintegracji, na podstawie Tchobanoglous`a i in. [22], wykonano obliczenia:

- Indeksu gęstości osadu na podstawie wzoru:

$$I.G.O = \frac{m}{V \cdot 10} \left[g/cm^3\right] \quad (1)$$

gdzie: m – masa zawiesin ogólnych w próbce [g/dm^3],
V – objętość osadu odczytana po 30 minutach sedymentacji próbki o objętości 1000 cm^3 [cm^3/dm^3].

- Indeksu objętości osadu na podstawie wzoru:

$$I.O.O = \frac{1}{I.G.O} \left[cm^3/g\right] \quad (2)$$

- Prędkości zagęszczania na podstawie wzoru:

$$v = \frac{\bar{V_r} - V_n}{t_n} \left[mm/s\right] \quad (3)$$

gdzie: V_r – wysokość słupa osadu użyta w procesie sedymentacji [400 mm],
V_n – objętość osadu dla n czasu sedymentacji [mm],
t_n – czas sedymentacji [s].

Przeprowadzono 5 serii badawczych, z których wyliczono średnią arytmetyczną.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zagęszczanie osadów wykorzystywane jest do przetwarzania osadów wstępnych, nadmiernych lub ich mieszanin. Polega na sedymentacji cząstek osadu oraz ich komprymacji pod wpływem działania siły ciężkości [2], co prowadzi do zwiększenia zawartości suchej masy w osadzie, a w konsekwencji do znacznego zmniejszenia jego objętości [14].

Uzyskane wyniki badań potwierdzają korzystny wpływ analizowanych metod dezintegracji jako czynnika intensyfikującego proces zagęszczania. Wydłużanie czasu działania mikrofal oraz zwiększanie objętości suchego lodu do osadu nadmiernego skutkuje likwidacją pęcznienia (zmniejszeniem objętości) i flotacji osadów oraz zmianą własności sedymentacyjnych w stosunku do osadu niezdezintegrowanego (tab. 1).

Kondycjonowanie osadu nadmiernego energią pola elektromagnetycznego i zestalonym ditlenkiem węgla, powoduje wzrost I.G.O w stosunku do próbki osadu nie poddanego dezintegracji w zależności od zastosowanego czasu działania mikrofal i stosunku objętościowego osadu do suchego lodu (rys. 1).

I.G.O. definiuje się jako masę zawiesin ogólnych wyrażoną w gramach, jaka przypada na objętość 100 cm^3 osadu poddanego 30 minutowemu procesowi sedymentacji [7].

Tabela 1. Zmiana objętości osadu (cm^3) po 30 minutach sedymentacji w wyniku wstępnego kondycjonowania
Table 1. Changes in the volume of sludge (cm^3) after 30 minutes of sedimentation as a result of preconditioning

Czas oddziaływania mikrofal [s]	Objętość osadu (cm^3) po 30 minutach sedymentacji	Dawka suchego lodu do osadu	Objętość osadu (cm^3) po 30 minutach sedymentacji
Osad czynny niedezintegrowany	910	osad czynny niedezintegrowany	910
120	808	1 : 0,25	860
180	753	1 : 0,5	690
240	748	1 : 0,75	620
300	715	1 : 1	430

Wzrost I.G.O. spowodowany był zmianą stosunków wodnych w próbkach i rozerwaniem kłaczków osadu, co przyczyniło się do ich wstępnego rozproszenia.

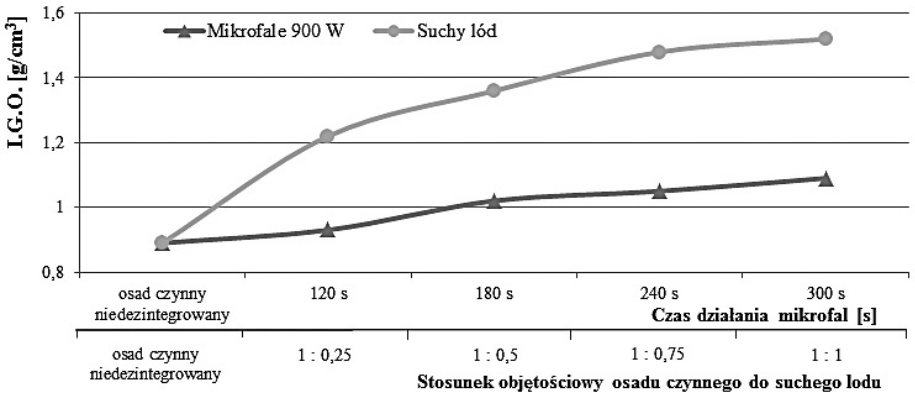
Destrukcja (mikrofalowa i termiczna suchym lodem) kłaczków i mikroorganizmów osadu nadmiernego powodowała uwalnianie wody związanej oraz wody związanej biologicznie, co przyczyniło się do szybszego odwadniania i lepszego zagęszczania osadu. I.G.O. wzrósł w procesie dezintegracji o 0,20 i 0,63 g/cm^3 odpowiednio dla promieniowania mikrofalowego (300 sekund) i zamrażania/rozmrażania (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1) (rys. 1).

Odwrotnością indeksu Donaldsona jest tzw. indeks Mahlmana, czyli Indeks Objętości Osadu (I.O.O.), określający własności sedymentacyjne oraz uwodnienie osadu. Jest to parametr, który przedstawia objętość osadu w cm^3 po 30 minutach sedymentacji, przypadająca na 1 g zawiesin ogólnych, oznaczonych w próbce pobranej z osadu czynnego [7]. Na podstawie I.G.O. obliczono I.O.O., którego średnia wartość wyniosła 112 cm^3/g dla prób kontrolnych. Jak przedstawiono na rys. 2, dla promieniowania mikrofalowego o mocy 900 W odnotowano mniejszy spadek wartości I.O.O. w porównaniu z dezintegracją osadu czynnego przy pomocy suchego lodu. Wartość I.O.O. osiągnęła dla czasu 300s działania promieniowania mikrofalowego 92 cm^3/g oraz 66 cm^3/g dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 (rys. 2). Obniżenie wartości indeksu poniżej 100 cm^3/g s.m., wskazuje na wysoką zdolność osadu czynnego nadmiernego do odwadniania w wyniku zastosowanych procesów kondycjonowania.

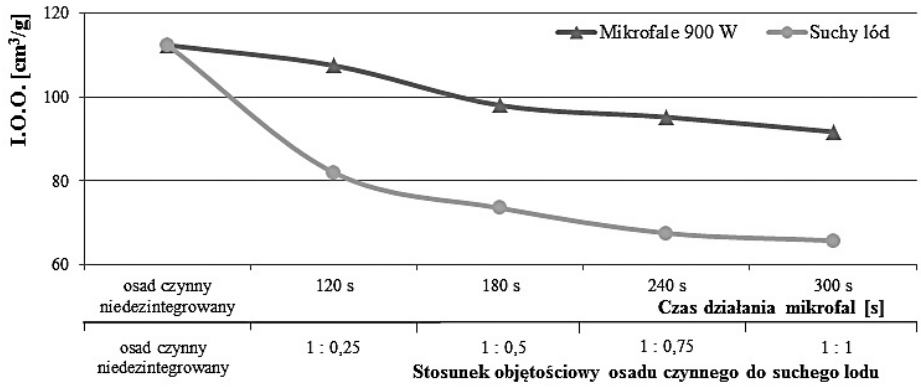
Obliczono prędkość opadania cząstek osadu czynnego w zależności od czasu ekspozycji na promieniowanie mikrofalowe i stosunek objętościowy osadu do suchego lodu.

Pole elektromagnetyczne i suchy lód wpływały początkowo na rozdrobnienie kłaczków, a następnie na ich rosnącą koncentrację oraz aglomerację. Powodowało to zmniejszenie odległości między kłaczkami osadu, zmniejszenie ich objętości, wzrost gęstości a przez to poprawę własności grawitacyjnych.

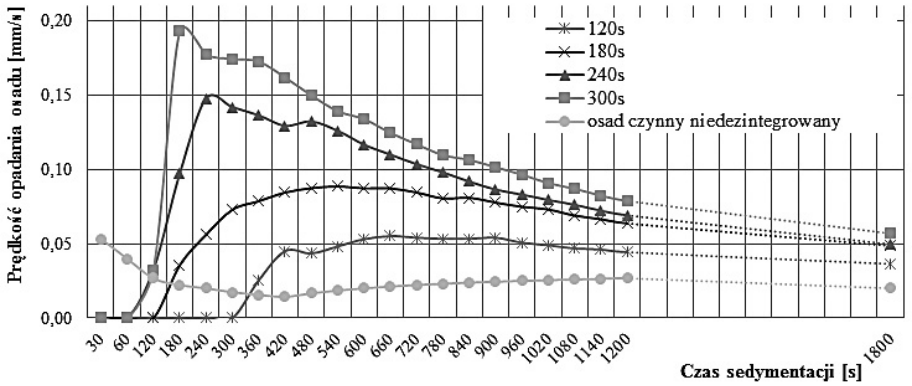
Na rysunku 3 i 4 przedstawiono zmiany prędkości opadania osadu czynnego w wyniku zwiększania czasu oddziaływania promieniowania mikrofalowego oraz dawki suchego lodu. Stwierdzono, że wydłużanie czasu dezintegracji mikrofalowej oraz zwiększenie objętości suchego lodu do osadu, wpłynęło na wzrost prędkości opadania kłaczków osadu czynnego, w pierwszych 3 minutach sedymentacji (rys. 3 i 4).



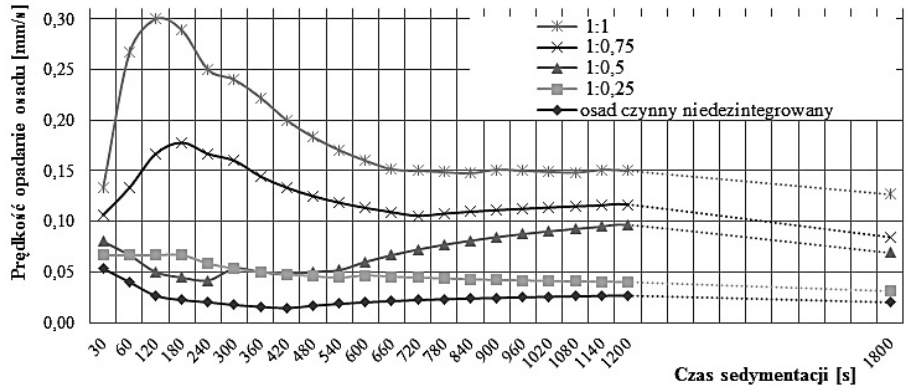
Rys. 1. Zmiana wartości I.G.O. osadu poddanego dezintegracji mikrofalowej i termicznej
Fig. 1. Sludge density index (SDI) changes after microwave and thermal sludge disintegration



Rys. 2. Zmiana wartości I.O.O. osadu poddanego dezintegracji mikrofalowej i termicznej
Fig. 2. Sludge volume index (SVI) changes after microwave and thermal sludge



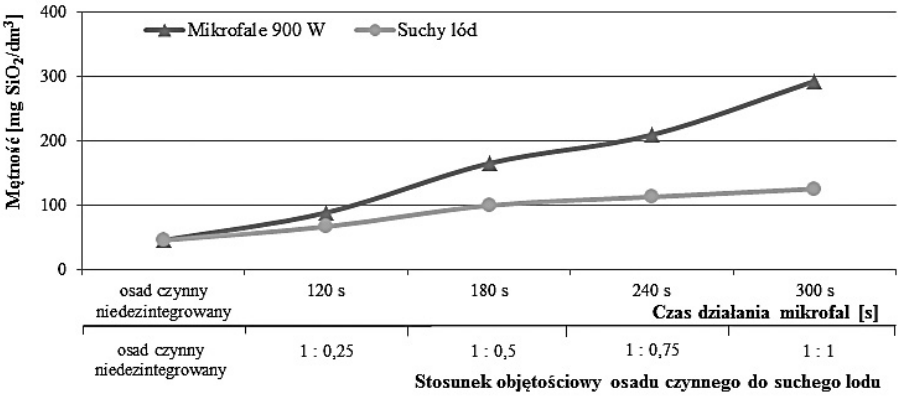
Rys. 3. Zmiana prędkości opadania osadu w wyniku dezintegracji mikrofalowej
Fig. 3. Changes of speed of sludge sedimentation after microwave sludge disintegration



Rys. 4. Zmiana prędkości opadania osadu w wyniku dezintegracji suchym lodem
Fig. 4. Changes of speed of sludge sedimentation after sludge disintegration by dry ice

Jednym z najważniejszych parametrów oceny procesu zagęszczania jest według teorii *Kyncha* prędkość opadania zawiesin. Prędkość opadania cząstek osadu jest funkcją stężenia zawiesin w najbliższym otoczeniu [5]. Wzrost prędkości opadania osadu dezintegrowanego (zwłaszcza w pierwszych minutach sedymentacji) związana była ze wcześniejszą destrukcją kłaczków, a następnie ich flokulacją, tworzeniem się agregatów o większej gęstości i mniejszej porowatości w stosunku do skupisk osadu przed dezintegracją. Podobne wyniki wzrostu sprawności fazy sedymentacyjnej (prędkości opadania) dla dezintegracji ultradźwiękowej uzyskał Bień i in. [1].

Przeprowadzone badania dotyczące wpływu promieniowania mikrofalowego i zamrażania/rozmrażania na sedymentację i zagęszczanie cząstek osadu ściekowego dowiodły, iż działanie mikrofal i suchego lodu wpływa znacząco na strukturę badanego materiału poprawiając właściwości sedymentacyjne osadu oraz zwiększając jego zdolność do odwadniania.



Rys. 5. Wpływ działania mikrofal i suchego lodu na mętność fezy płynnej osadu
Fig. 5. Effect of sludge disintegrationaly microwave and dry ice on the turbidity of the liquid phase

Warunkiem bezpośredniego działania jakiegokolwiek rodzaju promieniowania na żywą komórkę jest jego pochłonięcie, przy czym składniki komórek adsorbują fale o określonej długości. Promieniowanie mikrofalowe adsorbowane najskuteczniej jest w zakresie fali o długości 10^{-3} m [11]. Dlatego też efektywność stosowania energii mikrofalowej zależna jest przede wszystkim od czasu jej działania (dawki promieniowania).

Proces zamrażania suchym lodem/rozmrażania był również przyczyną niszczenia struktury kłaczków osadu i „zimnej" śmierci drobnoustrojów, spowodowanych zespołem czynników takich jak: szybkość zamrażania i odmrażania, skład chemiczny środowiska bytowania, gatunek bakterii, czas zamrożenia, temperatura. Jednakże na pierwszym miejscu stawia się mechaniczne niszczenie komórek kryształami lodu, rozrywającymi je od środka lub uszkadzającymi z zewnątrz. Mikroorganizmy zabite zamrażaniem/rozmrażaniem tracą do podłoża (środowiska)składniki komórkowe. Największą wrażliwość na zimny szok wykazują głównie bakterie Gramujemne oraz te, które są w logarytmicznej fazie wzrostu. Przeżywalność ich zmniejsza się 10 000 razy [11].

Zniszczenie mikrobiologicznej struktury kłaczków promieniowaniem mikrofalowym i suchym lodem przyczyniło się do wzrostu mętności fazy płynnej osadu głównie na skutek uwolnienia substancji wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowych polimerów. W osadzie nadmiernym nie poddanym dezintegracji mechanicznej, mętność cieczy nadosadowej wynosiła 46 mg SiO_2/dm^3 (rys. 5), a po procesie destrukcji mikrofalowej (300 sekund) i suchym lodem (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1 : 1), mętność zwiększyła się odpowiednio o 247 mg SiO_2/dm^3 i 79 mg SiO_2/dm^3 (rys. 5).

WNIOSKI

Kondycjonowanie osadu ściekowego mikrofalami i suchym lodem powoduje zmiany jego parametrów sedymentacyjnych:

1. Indeks objętości osadu ulegał obniżeniu wraz z czasem działania energii mikrofal i wzrostem stosunku objętościowego osadu do suchego lodu.
2. Dla zastosowanych procesów dezintegracji następował wzrost indeksu gęstości osadu. Zmiany wartości I.G.O. zależały od czasu działania mikrofal i stosunku objętościowego osadu do suchego lodu.
3. Opadanie osadu kondycjonowanego dwoma analizowanymi metodami zachodziło z największą intensywnością w pierwszych minutach zagęszczania grawitacyjnego.
4. Proces dezintegracji mikrofalowej i oddziaływanie suchym lodem powodowały wzrost mętności fazy płynnej osadu. Dla działania mikrofal w czasie 300 s o 247 mg SiO_2/dm^3 i o 79 mg SiO_2/dm^3 dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1.

LITERATURA

1. Bień J., Kamizela T., Kowalczyk M. 2005. Separacja grawitacyjna osadów poddanych kondycjonowaniu polem ultradźwiękowym. W: Zintegrowane, inteligentne systemy wykorzystania energii odnawialnej. Mater. konf. Częstochowa-Podlesice, 1–10.
2. Bień J. 2002. Osady ściekowe – teoria i praktyka. Wyd. Polit. Częst. Częstochowa.
3. Campios J.L., Otero L., Franco A., Mosquera-Corral A., Roca E. 2009. Ozonation strategies to reduce sludge production of a seafood industry WWTP. Bioresource Technology. 100, 1069–1073.

4. Chu C.P., Feng W.C., Chang B.V., Chou C., Lee D.J. 1999. Reduction of microbial density level in wastewater activated sludge via freezing and thawing. Water Research. 33, 3532–3535.
5. Cywiński B., Gdula S., Kempa E., Kurbiel J., Płoszański H. 1983. Oczyszczanie ścieków. Tom 1 – Oczyszczanie mechaniczne i chemiczne. Wyd. Arkady. Warszawa.
6. Dębowski M., Zieliński M. 2009. Możliwość zastosowania promieniowania mikrofalowego w procesach suszenia osadów powstających podczas oczyszczania ścieków. Woda Ścieki. 1, 8–11.
7. Gajkowska-Stefańska L., Guberski S., Gutowski W., Mamak Z., Szperliński Z. 2007. Laboratoryjne badania wody ścieków i osadów sciekowych. Część II. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej. Warszawa.
8. Grűbel K., Machnicka A., Suschka J. 2009. Scum hydrodynamic disintegration for waste water treatment efficiency upgrading. Ecol. Chem. Eng. S. 16, 359–367.
9. Grübel K., Machnicka A. 2011. Impact of microwave disintegration on activated sludge. Ecol. Chem. Eng. S. 18, 75–82.
10. Grűbel K., Machnicka A., Nowicka E., Wacławek S. 2014. Mesophilic-thermophilic fermentation process of waste activated sludge after hybrid disintegration. Ecol. Chem. Eng. S. 1, 125–136.
11. Kotełko K., Sedlaczek L., Lachowicz M.T. 1984r. Biologia bakterii. Państwowe Wyd. Naukowe. Warszawa.
12. Krzemieniewski M., Dębowski M., Zieliński M. 2012. Zastosowanie elektromagnetycznego promieniowania mikrofalowego i stałego pola magnetycznego w procesach oczyszczania ścieków i przeróbki osadów ściekowych. Wyd. Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego. Olsztyn.
13. Lugue-Garcia J.L., Lugue de Castro M.D. 2003. Where is microwave-based analytical equipnent for solid sample pre-treatment going?. TrAC. 22, 90–98.
14. Miksch K., Sikora J. 2010. Biotechnologia ścieków. Wyd. PWN, Warszawa.
15. Montusiewicz A., Lebiocka M., Rożej A., Zacharska E., Pawłowski L. 2010. Freezing/thawing effects on anaerobic digestion of mixed sewage sludge. Bioresource Technol. 101, 3466–3473.
16. Műller J. 2000. Disintegration as key-stop in sewage sludge treatment. Wat. Sci. Technol. 41, 123–139.
17. Nowicka E., Machnicka A. 2014. Higienizacja osadu nadmiernego suchym lodem. Proceedings of ECOpole. 1, 239–247.
18. Nowicka E., Machnicka A. 2013. Ocena skuteczności higienizacji osadu nadmiernego suchym lodem. Współczesne problemy ochrony środowiska. Rozdział w Monografii. Gliwice. Str. 105–113.
19. Nowicka E., Machnicka A. 2014. Wpływ dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem na uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej. GWTS, 8, 307–310.
20. Podedworna J., Umiejewska K. 2008. Technologia osadów ściekowych. Wyd. Politechniki Warszawskiej. Warszawa.
21. Roman H.J., Burgess J.E., Pletschke B.I. 2006. Enzyme treatment to decrease solids and improve digestion of primary sewage sludge. Afr. J. Biotechnol. 5, 963–967.
22. Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. 2002 Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4th edition, Mc Graw Hill. New York.
23. Vesilind P.A., Martel J. 1990. Freezing of water and wastewater sludges. J. Envir. Eng. 116, 854–862.
24. Woodard S.E., Wukasch R.F. 1994. A hydrolysis/thickening/filtration process for the treatment of waste activated sludge. Water Sci. Technol. 30, 29–38.
25. Zhang G., Zhang P., Yang J., Chena Y. 2007. Ultrasonic reduction of excess sludge from the activated sludge system. J. Hazard. Mater. 145, 515–519.
26. Zieliński M. 2013. Wpływ mikrofalowego promieniowania elektromagnetycznego na proces fermentacji metanowej. Wyd. Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego, Olsztyn.

[3A]

Nowicka E., Machnicka A., Grűbel K. (2014) Improving of anaerobic digestion by dry ice disintegration of activated sludge. Ecological Chemistry and Engineering A. 21(2), 211 – 219. DOI: 10.2428/ecea.2014.21(2)17.

DOI: 10.2428/ecea.2014.21(2)17 ECOL CHEM ENG A. 2014;21(2):211-219

Ewelina NOWICKA[1*], Alicja MACHNICKA[1]
and Klaudiusz GRÜBEL[1]

IMPROVING OF ANAEROBIC DIGESTION BY DRY ICE DISINTEGRATION OF ACTIVATED SLUDGE

DEZINTEGRACJA OSADU CZYNNEGO SUCHYM LODEM W CELU INTENSYFIKACJI FERMENTACJI METANOWEJ

Abstract: Disintegration by dry ice has a positive effect on the degree and rate of surplus activated sludge anaerobic digestion. By applying thermal disintegration the lysis of cells occurs in minutes instead of days. The intracellular and extracellular components are set free and are immediately available for biological degradation which leads to an improvement of the subsequent anaerobic process. Thermal disintegration by dry ice of the surplus activated sludge results in organic matter and a polymer transfer from the solid phase to the liquid. During the disintegration process, soluble chemical oxygen demand (SCOD) value and proteins concentration increase about 583 mg/dm^3 and 265 mg/dm^3, respectively. At the same time the concentration of carbohydrates increase about 53 mg/dm^3. In addition the degree of thermal disintegration changed from 13 % for the volume ratio of dry ice to surplus activated sludge 0.25:1 to 49 % for the volume ratio of dry ice to sludge 1:1.

The addition of thermal disintegrated sludge (30 %SASDI of volume) to the digestion process leads to increased biogas production about 49 %.

Keywords: dry ice, soluble chemical oxygen demand, proteins, carbohydrates, anaerobic digestion, biogas

Introduction

The aim of wastewater treatment is to mineralise organic matter and enhance nutrient removal. Anaerobic digestion is a common method for surplus activated sludge stabilization resulting in the reduction of sludge volatile matter and the production of biogas. Anaerobic degradation of biomass is considered to follow a sequence of four phases: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis. The slow degradation rate of surplus activated sludge in the anaerobic digestion process is due to the

[1] Department of Environmental Microbiology and Envirenmental Biotechnology, Institute of Environmental Protection and Engineering, University of Bielsko-Biala, 43–309 Bielsko-Biała, ul. Willowa 2, Poland, phone: +48 33 827 91 57.

* Corresponding author: enowicka@ath.bielsko.pl

rate-limiting step of sludge hydrolysis. Therefore, the disintegration pretreatment of a surplus activated sludge process using physics (thermal) [1, 2], chemical (using *eg* acids) [3], mechanical (ball mill, ultrasonic) [4–6], oxidation (ozone and hydrogen peroxide) [7, 8], or biological (using enzymes) [9–11] and thermal (heat treatment, freezing/thawing) [12–14] treatment processes, can improve the subsequent anaerobic digestion. Although the methods are different, the aim of all of them is partial or complete bacterial cell rupture, *ie* destruction of the cell wall and release of organic substances present inside the cells to the liquid phase. Thermal disintegration by dry ice has a positive effect on the degree and rate of sludge anaerobic digestion.

The freeze/thaw frequently found in nature, which leads to changes in soil. This process is used in the municipal wastewater treatment for dewatering of sewage sludge. Sludge dewatering by freezing is done by separating the solid and liquid fractions during the formation of ice crystals. It was also found that the refrigeration mechanism is conducive to converting the form of flocs in a more compact, dense [15].

Freezing/thawing using by dry ice is an effective technique for dewatering, sewage sludge and its attention was already 1990 by Vesilind and Martel [16]. Dry ice transforms the structure of flocs into larger agglomerates and reducing water-related because the process of freeze/thaw by dry ice is becoming more and more popular [17–21].

Basic mechanisms of freeze/thaw sludge used as a method of conditioning of sludge prior to anaerobic stabilization are increasing interest due to the reduction of pathogenic bacteria, reduce sediment and increase the biomass production of biogas [22, 23].

Dry ice is a completely natural product. It is produced in the form of granules for compressing gaseous carbon dioxide to liquid form, removing the heat generated by compression, and then rapid expansion. This expansion and rapid evaporation of carbon dioxide gas remaining fluid which cooled to the melting point and freezing in the CO_2 "snow", which takes the form of beads or prills. The dry ice sublimes at –78.5 ^{o}C and a pressure of 1013.25 hPa. Its heat of sublimation is 573 kJ, which means that it is approximately 3.3 times more effective coolant than water ice (with the same volume). Its specific gravity comprises in the range from 1.2 kg/dm^3 to 1.6 kg/dm^3, and its hardness on the Mohs scale is 2, which corresponds to the hardness of gypsum. It is anhydrous, non-flammable, non-toxic and has no smell or taste. It is intended as a catering, refrigeration, to clean all types of machines and laboratories to slow exothermic reactions [24, 25].

The new concept described in this paper is based on the combined process of surplus activated sludge disintegration by dry ice prior to anaerobic digestion. Thermal disintegration by dry ice can activate the biological hydrolysis process and therefore significantly increase the biogas production in anaerobic stabilization.

Materials and methods

Experimental material was surplus activated sludge taken from the municipal wastewater treatment plant in the south of Poland, working according to the Enhanced Biological Nutrient Removal (EBNR). The plant was designed for a flow of 120 000

m^3/d. At present the amount of treated wastewater is about 90 000 m^3/d. Solid retention time (SRT) is about 14 days and concentration of mixed liquid suspended solids (MLSS) 4.3–4.7 g/dm^3.

Thermal disintegration

The disintegration of surplus activated sludge, the following ratios by volume of dry ice to sludge, *ie*: 0.25:1; 0.5:1; 0.75:1; 1:1.

The chemical analysis

Soluble chemical oxygen demand (SCOD) and proteins value was determined for samples before and after each time of disintegration according to *Standard Methods* [26]. Carbohydrate concentration was determined according to Anthron methods [27].

The degree of disintegration

In order to obtain a quantitative measure of the effects of disintegration, Kunz and Wagner [28] have proposed a coefficient which they called the degree of disintegration (DD). Later this coefficient was modified by Müller [29]. In this paper the degree of sludge disintegration was determined according to that given by Müller [30] as follows:

$$DD = [(SCOD_1 - SCOD_2) / (SCOD_3 - SCOD_2)] \cdot 100 \ [\%],$$

where: DD – the degree of disintegration;
$SCOD_1$ – the SCOD of the liquid phase of the disintegrated sample;
$SCOD_2$ – the SCOD of the original sample;
$SCOD_3$ – the value after the chemical disintegration.

Chemical disintegration was done in this case by treating the sludge samples for 10 min at 90 °C after adding NaOH, 1 M, in a ratio of 1:2. Centrifugation in all cases was done for 10 min at 30 000 g.

The fermentation experiments

The anaerobic digestion experiments were performed in six glass fermenters (3 dm^3) operated in parallel at a temperature of 35 ± 1°C. Residence time was 23 days. The volume of producing biogas was determined by the liquid displacement method ever each day. Different rates of raw and disintegrated surplus activated sludge were applied:

– **Fermenter 1** was feed with surplus activated sludge (70 % volume of fermenter; 70 %SAS) and digested sludge (30 % volume of fermenter; 30 %DS),

– **Fermenter 2** was feed with 50 %SAS and 30 %DS and with surplus activated sludge after dry ice disintegration (20 % volume of fermenter; 20 %SASDI),

– **Fermenter 3** was feed with 40 %SAS and 30 %DS and 30 %SASDI,

– **Fermenter 4** was feed with 30 %SAS and 30 %DS and 40 %SASDI,
– **Fermenter 5** was feed with 20 %SAS and 30 %DS and 50 %SASDI,
– **Fermenter 6** was feed with 30 %DS and 70 %SASDI.

The aim of carrying out the experiment of sludge digestion was to show the possibilities to improve and accelerate the anaerobic process. The investigations presented here were performed in 5 stages, and arithmetic average and standard deviation were established. The standard deviation was determined according to the estimator of the highest credibility in STATISTICA 6.0.

Results and discussions

Increase of volume of freezing water in the cytoplasm of microorganisms causes them disruption by mechanical damage of the walls and cell membranes, osmotic shock and destruction of cellular organelles. These mechanical damage is caused by the formation of ice crystals in the environment surrounding of cells as well as in their interior, which leads to changes in their properties (denaturation) [31, 32]. These crystals cause damage and changes in properties of microbial cells, which leads to release of intracellular substances into the environment.

The disintegration of surplus activated sludge by dry ice resulted in the release of organic matter (expressed as SCOD). Disrupter of flocs and microbial cells of activated sludge leads to the release of intracellular organic compounds to liquid phase. The value of SCOD in supernatant liquid of surplus sludge 63 mg/dm^3 (Fig. 1), while during the dry ice disintegration process increase:

– for the volume ratio of dry ice to sludge 0.25:1, the value of SCOD was 210 mg/dm^3 (Fig. 1),

– for the volume ratio of dry ice to sludge 0.5:1, the value of SCOD was 363 mg/dm^3 (Fig. 1),

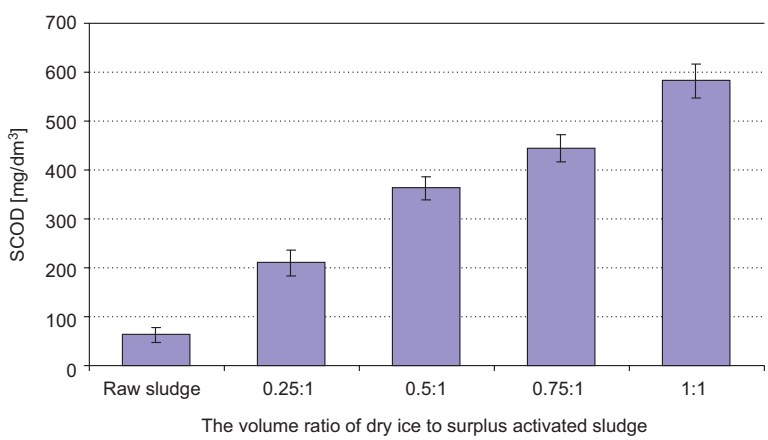


Fig. 1. Changes of SCOD value in the sludge supernatant before and after the disintegration

– for the volume ratio of dry ice to sludge 0.75:1, the value of SCOD was 445 mg/dm^3 (Fig. 1),

– for the volume ratio of dry ice to sludge 1:1, the value of SCOD was 583 mg/dm^3 (Fig. 1).

Freezing/thawing by dry ice of surplus activated sludge caused disruption of flocs structure and resulted in a different degree of disintegration (DD). The effect of dry ice (various volumes) on the sludge degree of disintegration was studied. The results of the experiments are presented in Fig. 2.

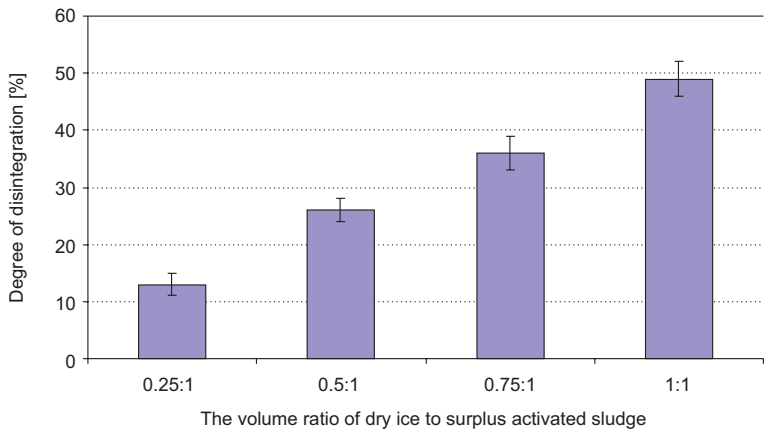


Fig. 2. Degree of surplus activated sludge disintegration by dry ice

Within the range of dry ice volume, between 0.25:1 to 1:1, the degree of disintegration increased most rapidly. The achieved degree of sludge disintegration was about 49 % (Fig. 2).

The effectiveness of the dry ice disintegration effect of these relations by volume of sludge to dry ice were as follows:

– for the volume ratio of dry ice to sludge 0.25:1, DD was 13 % (Fig. 2),

– for the volume ratio of dry ice to sludge 0.5:1, DD was 26 % (Fig. 2),

– for the volume ratio of dry ice to sludge 0.75:1, DD was 36 % (Fig. 2),

– for the volume ratio of dry ice to sludge 1:1, DD was 49 % (Fig. 2).

The disintegration of raw sludge resulted in the release of proteins. The increase of proteins concentration were associated with the destructive effects of dry ice in the cells, which resulted in the release of organic matter into the liquid phase. The proteins and carbohydrates concentration in untreated surplus activated sludge supernatant was 39 mg/dm^3 and 15 mg/dm^3, respectively. These concentrations increase with volume of dry ice (Fig. 3).

Freezing/thawing disintegration by dry ice accelerates the biological degradation of sludge. The cell liquid contains components, which upon being released, can be easily assimilated. The released organic substances (expressed here, as SCOD) as a result of

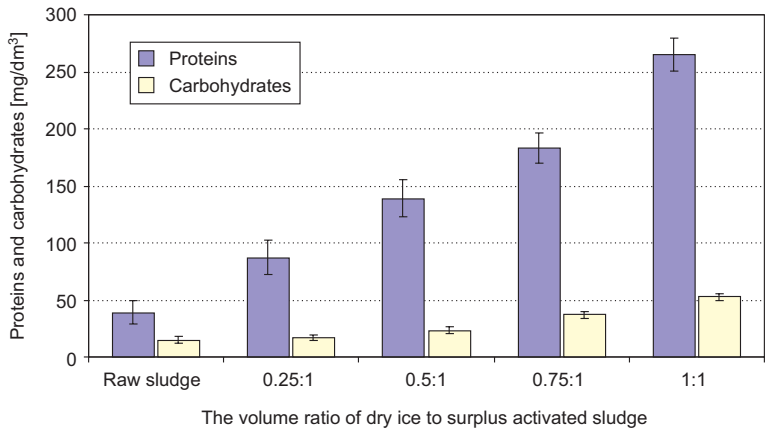


Fig. 3. Changes proteins and carbohydrates concentration before and after disintegration of dry ice

surplus activated sludge flocs disintegration, lead to a substantial increase of biogas production in the subsequent anaerobic sludge digestion process (Fig. 4).

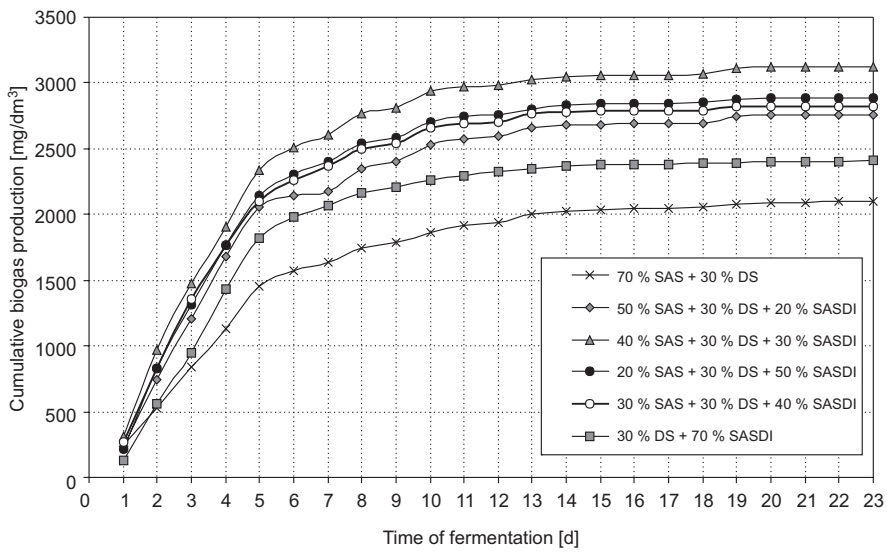


Fig. 4. Changes of cumulative biogas production during anaerobic digestion

Significantly higher amounts of biogas were produced in the fermenters feed with disintegrated activated sludge (20 %, 30 %, 40 %, 50 % or 70 % volume of fermenter). The gas production during sludge digestion depends on volatile solids, degree of disintegration (expressed as COD) and fermentation time.

Figure 4 shows the development of biogas production after 23 days of fermentation. Comparing the results it can be concluded that in the case of sample with addition

disintegrated sludge in volume of 70 %, there was a smaller production of biogas (2 408 cm^3/dm^3) than in sample involving 40 % (2826 cm^3/dm^3) and 50 % (2890 cm^3/dm^3) of volume of surplus activated sludge after thermal destruction. Low biogas production is probably due to too high load of organic matter introduced into the digester. The samples with 30 % of volume of disintegrated surplus activated sludge produced 3 124 cm^3/dm^3 of biogas, which gives a 49 % more of biogas in comparison to the blank sample (70 % SAS + 30 % DS) (Fig. 4).

The organic matter transferred by dry ice treatment from the sludge solids into the liquid phase was readily biodegradable. Surplus activated sludge consists mainly of heterotrophic bacteria. The gradual break–up of the bacterial cell walls limits the degradation process. By applying freezing/thawing disintegration the lysis of cells occurs in minutes instead of days. The intracellular and extracellular components are set free and are immediately available for biological degradation which leads to an improvement of the subsequent anaerobic process. In Fig. 4, this is shown by comparing the increase of biogas production in the anaerobic digestion, post thermal disintegration. A calculation of energy consumption and cost shows that the disintegration by dry ice is an economically viable process. The surplus gas can be used for power and heat production. This energy yield can be used for the thermal disintegration of surplus activated sludge. The reduced cost of the sludge disposal, enhanced fermentation rates and acceleration of biogas production should lead to the practical use of disintegration by dry ice as a new technology.

Conclusions

The experiments have clearly demonstrated that thermal disintegration is a suitable method to destroy surplus activated sludge micro-organisms. In this study, the addition of disintegrated by dry ice raw sludge was examined in order to improve the anaerobic digestion process. The most important conclusions are:

– The disintegration by dry ice surplus activated sludge destroys the flocs structure of sludge and ruptures the cells of the micro-organisms. As a result of sludge disintegration, organic matter is transferred from the sludge, solid phase into the liquid phase (expressed as SCOD). SCOD increased from 63 mg/dm^3 to 583 mg/dm^3 in direct proportion with the time needed for disintegration.

– With increasing doses of dry ice, the degree of disintegration and increased volume ratio of the excess sludge to a dry ice 1:1 was 49 %.

– As a result of disintegration of surplus activated sludge dry ice, the destruction of cell structures of microorganisms and thereby increasing the concentration of proteins. In the settlement is not subjected to excessive disintegration of the dry ice, the concentration of protein amounted to 39 mg/dm^3, and the volume ratio of dry ice to precipitate 1:1, protein concentration was 265 mg/dm^3.

– An additional effect of the destructive action of dry ice on microorganisms excessive sludge was released into the supernatant fluid concentrations of organic matter expressed carbohydrates. With the increasing volume of dry ice to precipitate obtained significantly increasing the concentration of carbohydrates. For the ratio of the

volume of dry ice to precipitate 1:1 carbohydrate concentration increased by 38 mg/dm^3.

– The thermal disintegration of surplus activated sludge leads to a higher degree of degradation and higher biogas production. Addition of disintegrated sludge (30 % volume of fermenter) to the anaerobic digestion stage resulted in increased biogas production, about 49 %.

References

[1] Wett B, Phothilangka P, Eladawy A. Waste Management. 2010;30:1057-1062. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.12.011.
[2] Barjenbruch M, Kopplow O. Adv Environ Research. 2003;7:715-720. DOI: 10.1016/S1093-0191(02)00032-1.
[3] Young-Khee O, Ki-Ryong L, Kwang-Baik K, Ick-Tae Y. Water Research. 2007;41:2665-2671. DOI: 10.1016/j.watres.2007.02.028.
[4] Tiehm A, Nickel K, Zellhorn M, Neis U. Water Research. 2001; 35:2003-2009. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00468-1.
[5] Panyue Z, Guangming Z, Wei W. Bioresource Technol. 2007;98:207-210. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.12.002.
[6] Dong-Hoon K, Emma J, Sae-Eun O, Hang-Sik S. Water Research. 2010;44:3093-3100. DOI: 10.1016/j.watres.2010.02.032.
[7] Guangming Z, Jing Y, Huanzhi L, Jie Z. Bioresource Technol. 2009;100:1505-1509. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.08.041.
[8] Tak-Hyun K, Sang-Ryul L, Youn-Ku N, Jeongmok Y, Chulhwan P, Myunjoo L. Desalination. 2009;246:275-284. DOI: 10.1016/j.desal.2008.06.023.
[9] Barjenbruch M, Kopplow O. Adv Environ Research. 2003;7:715-720. DOI: 10.1016/S1093-0191(02)00032-1.
[10] Guang-Hui Y, Pin-Jing H, Li-Ming S, Yi-Shu Z. Water Research. 2008;42:1925-1934. DOI: 10.1016/j.watres.2007.11.022.
[11] Azize A, Ayse F, Diclehan S, Ersan K. J Environ Sci Health, Part A: Toxic/Hazardous Subst Environ Eng. 2008;43:1528-1535. DOI: 10.1080/10934520802293685.
[12] Stabnikova O, Liu XY, Wang, JY. Elsevier Science. 2008;28:1654-1659. DOI: 10.1016/j.wasman.2007.05.021.
[13] Saktaywin W, Tsuno H, Nagare H, Soyama T, Weerapakkaroon J. Water Research. 2005;39:902-910. DOI: 10.1016/j.watres.2004.11.035.
[14] Montusiewicz A, Lebiocka M, Rożej A, Zacharska E, Pawłowski L. Bioresource Technol. 2010;101:3466-3473. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.125.
[15] Jean DS, Lee DJ, Chang CY. Direct sludge freezing using dry ice. Adv Environ Research. 2001;5:145-50.
[16] Vesilind PA, Martel CJ. J Environ Eng. 1990;116:854–862. DOI: 10.1061/(ASCE)0733-9372(1990)116:5(854).
[17] Örmeci B, Vesilind AP. Water Research. 2001;35:4299-4306. DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00174-9.
[18] Jean DS, Chu CP, Lee DJ. Water Research. 2000;34:1577-1583. DOI: 10.1016/S0043-1354(99)00303-6.
[19] Wang Q, Fujisaki K, Ohsumi Y, Ogawa IH. J Environ Sci Health, Part A: Toxic/Hazardous Subst Environ Eng. 2001;36:1361-1371. DOI: 10.1081/ESE-100104884.
[20] Jean DS, Chu CP, Lee DJ. Separation Sci Technol. 2001;36:2733-2746. DOI: 10.1081/SS-100107222.
[21] Hu K, Jun-Qiu J, Qing-Liang Z, Duu-Jong L, Kun W, Wei Q. Water Research. 2011;45:5969-5976. DOI: 10.1016/j.watres.2011.08.064.
[22] Grübel K, Chrobak E, Rusin A, Machnicka A. Eliminacja *Clostridium perfringens* podczas kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego. Inż Ekol. 2013;32:40-47.
[23] Nowicka E, Machnicka A. Ocena skuteczności osadu nadmiernego suchym lodem. Współczesne problemy ochrony środowiska. Gliwice: Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska; 2013.

[24] Jeyasekaran G, Ganesan P, Anandaraj R, Jeya Shakila R, Sukumar D. Food Microbiol. 2006;23:526-533. DOI: 10.1016/j.fm.2005.09.009.
[25] Franceschini O. Dewatering of sludge by freezing. University of Technology. Luleĺ;2010.
[26] Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD, (eds.). STANDARD METHODS. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th edn.). Washington: American Public Health Association; 1999.
[27] Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, (4th edition) Metcalf & Eddy, Inc. 2002.
[28] Kunz P, Wagner S. Results and outlooks of investigations of sewage sludge disintegration – Ergebnisse und Perspektive aus Untersuchungen zur Klärschlammdesintegration. Heft 1: AWT Abwassertechnik; 1994.
[29] Müller J. Mechanical disintegration of sewage sludge – Mechanischer Klärschlammaufschluß-, Schriftenereihe "Berichte aus der Verfahrenstechnik" der Fakultät für Maschinenbau und Elektrotechnik der Universität Braunschweig. Germany: Shaker Verlag, Aachen; 1996.
[30] Müller J. Disintegration as key-stop in sewage sludge treatment. Water Sci Technol. 2000;41:123-139.
[31] Bollag DH, Edelstein SJ. Protein Methods. New York: Wiley&Liss; 1992.
[32] Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Tom 1. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2007.

DEZINTEGRACJA OSADU CZYNNEGO SUCHYM LODEM W CELU INTENSYFIKACJI FERMENTACJI METANOWEJ

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej, Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska
Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej

Abstrakt: Jednym z podstawowych problemów występujących w układach przeróbki osadów ściekowych jest zwiększenie dostępności i podatności substancji organicznych na biodegradację, co można osiągnąć poprzez dezintegrację osadu.

W pracy wykorzystano dezintegrację osadu nadmiernego suchym lodem oraz określono jej wpływ na uwalnianie materii organicznej i na efektywność fermentacji metanowej wyrażonej produkcją biogazu.

Zamrażanie/rozmrażanie osadu suchym lodem powodowało wzrost wartości uwolnionego ($UChZT_{Cr}$) o 520 mg O_2/dm^3, a stopień dezintegracji (SD) wyniósł 49 %. W wyniku destrukcji osadu przy pomocy suchego lodu do cieczy nadosadowej zostały również uwolnione proteiny oraz węglowodany, co świadczyło o skuteczności procesu. Stężenia tych parametrów wyniosły odpowiednio 265 mg/dm^3 i 53 mg/dm^3.

Poddanie fermentacji mieszanki: osadu zdezintegrowanego w objętości 30 %, osadu niezdezintegrowanego w objętości 40 % i 30 % osadu przefermentowanego, spowodowało wzrost wydajności produkcji biogazu o 49 %.

Słowa kluczowe: suchy lód, $ChZT_{Cr}$, proteiny, węglowodany, fermentacja metanowa, biogaz

[4A]

Nowicka E., Machnicka A. (2014) Hygienization of surplus activated sludge by dry ice. Ecological Chemistry and Engineering S. 21(4), 651 – 660. DOI: 10.1515/eces-2014-0047.

DE GRUYTER OPEN

DOI: 10.1515/eces-2014-0047 ECOL CHEM ENG S. 2014;21(4):651-660

Ewelina NOWICKA[1*] and Alicja MACHNICKA[1]

HYGIENIZATION OF SURPLUS ACTIVATED SLUDGE BY DRY ICE

HIGIENIZACJA OSADU NADMIERNEGO SUCHYM LODEM

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 SiO_2 dm^{-3} has been proven, as well as an increase in the value of COD_{Cr} by 549 mg O_2 dm^{-3}, which indicates the release of organic matter into the liquid phase.

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

Introduction

A primary objective of sludges treatment is their stabilizing. Stabilized sludges have a favourable chemical composition, excellent soil-forming properties and generally return water well. However, the conditioning processed being used do not provide a product that is completely safe in terms of sanitary matters due to the fact that they are occupied by bacteria, viruses, parasitic worms, fungi, protozoa and other microorganisms. They include both pathogenic microorganisms, dangerous to human, and saprophytic ones, neutral from the sanitary point of view. The presence of pathogenic organisms in sewage sludges is therefore a sanitary hazard for the environment.

The assessment of a sanitary condition of sludges is based on the indirect conclusion on the content of pathogenic bacteria and eggs of intestinal parasites and is based on

[1] Department of Microbiology and Environmental Biotechnology, Institute of Environmental Protection and Engineering, University of Bielsko-Biala, ul. Willowa 2, 43-309 Bielsko-Biała, Poland, phone +48 33 827 91 57

[*] Corresponding author: enowicka@ath.bielsko.pl

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

determining so called sanitary indicator. Until recently, the species being a sanitary indicator among bacteria was a lactose-positive rods *Escherichia coli*. Currently, under the Regulation of the Minister of the Environment [1], a new bacteria indicator *Salmonella* sp. is being used in sanitary assessment. *Salmonella* sp. is a relatively anaerobic rods, commonly present in sewage, sewage sludges and contaminated water. The time of its survival in the environment is approximately 3 months [2]. The role of *Salmonella* sp. rods in the pathogenesis of human infections has increased significantly in recent years [3]. A minimum infectious dose for this pathogen is from 10 to 10^{10} of cells [2]. *Salmonella* sp. is, among others, the cause of 86% of *gastroenteritis* met [3], typhoids, multi-organ infections and sepsis [4, 5]. The effect of its toxic actions results from the release of lipopolysaccharide endotoxin [6].

Clostridium perfringens are spore-forming rods, present in sewage, sewage sludges, soil contaminated with faeces and the gastrointestinal tract of humans and animals. It is a strictly anaerobic bacteria, able to survive in the environment for a long period of time due to the ability of creating conditions of unfavourable endospores. It may cause wound infections or nosocomial infections and food poisoning as a result of consuming food or water contaminated with spores that are resistant to temperature and disinfection [2, 4, 7].

The risk of infecting the environment with pathogens originating from sewage sludges requires seeking new methods to improve their sanitary status. Some of the methods used in sewage biotechnology are used for sewage sludges disintegration: thermal energy [8, 9], enzymes [10, 11], ozonation [12, 13], acidification [14], alkalization [15], the use of high pressure [16-18], mechanical grinding [19], ultrasounds [20-24], hydrodynamic cavitation [25-27], microwave radiation [27-31].

As a result of disintegration the disruption of cell envelopes takes place (cytoplasmic membrane and/or cell wall), which causes the destruction of microorganisms and thus the release of the organic substrate and intracellular enzymes into the environment [31]. On this basis, the concept of the use of dry ice to hygienization of surplus activated sludge was revealed.

Dry ice is a carbon dioxide in the solid state which is formed by expansion of liquid carbon dioxide under normal conditions (temperature of 273 K (–0.15°C), pressure of 1013.25 hPa). The dry ice sublimes at –78.5°C and a pressure of 1013.25 hPa. Its heat of sublimation is 573 kJ, which means that it is approximately 3.3 times more effective coolant than water ice (with the same volume). Its specific gravity comprises in the range from 1.2 to 1.6 kg/dm^3, and its hardness on the Mohs scale is 2, which corresponds to the hardness of gypsum. It is anhydrous, non-flammable, non-toxic and has no smell or taste [32].

It is widely used as a coolant in laboratories, industrial cold rooms, alone or as a constituent of cooling mixtures, and prevents the growth of fungi and bacteria; therefore it is used for transportation of perishable food products. In temperature baths, dry ice is usually used in the form of cooling mixture, consisting of crushed dry ice and organic solvent of a low freezing point (> –80°C), for example, acetone or ethanol [33]. Today it is also used for industrial cleaning.

The aim of the study was to demonstrate the destructive effect of dry ice on the structure of surplus activated sludge, shown by the release of organic matter, changes in turbidity of supernatant liquor and hygienization.

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

Material and methods

The experimental material was surplus activated sludge from sewage treatment plants, using advanced biological wastewater treatment processes, involving the simultaneous removal of organic compounds and nitrogen and phosphorus. The sewage treatment plant was designed for the flow of 120 000 m^3 d^{-1}. At the moment, the amount of draining off sewage is approximately 90 000 m^3 d^{-1}, the wastewater retention time is about 14 days and the concentration of the active sludge in the bioreactor is about 4500 mg dm^{-3}.

Hygienization/disintegration of sludge by dry ice

Hygienization/disintegration by freezing/thawing a sample of 1 dm^3 of surplus activated sludge was executed with dry ice. For hygienization/disintegration of surplus activated sludge the following volume ratios of the surplus sludge to dry ice were used, *ie* 1 : 0.25; 1 : 0.5; 1 : 0.75; 1 : 1.

The time in which samples stay in the frozen state depends on the applied volume of the dry ice:

- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25, 1.5 hours,
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.5, 2 hours,
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.75, 3 hours,
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, 4.5 hours.

Microbiological analysis

The samples of surplus sludge for microbiological analysis were collected into sterilized hermetically sealed glass containers with a volume of 250 cm^3. The material was delivered to the laboratory within 15 to 30 minutes from its collection.

The analyses in surplus sludge were performed before and after the hygienization process by dry ice in terms presence bacteria of *Salmonella* and *Clostridium perfringens.* The determinations of microorganisms were made in accordance with Project Routes (2011-2014), Novel processing routes for effective sewage sludge management procedure. Innovative system solutions for municipal sludge treatment and management. Grant agreement n°265156 [34]. The studies related also to the total number of bacteria contained in the surplus sludge before and after the destruction of the dry ice.

As the culture media, the following were used: Nutrient Agar, Buffered Peptone Water supplemented Novobiocin, Rappaport-Vassiliadis Medium, Hektoen Enteric, SMS Agar, SPS Agar. In order to verify the taxonomic classification of *Salmonella* sp. the API 20E biochemical test and the MUCAP test were used.

Salmonella sp. - principle of the method

This is a method recovery of sub-lethaly *Salmonella* sp. In this method detection of *Salmonella* sp. is undertaken in main five steps:

- pre-enrichment of bacteria in primary selective medium (Buffered Peptone Water Medium),
- enrichment in secondary selective medium which inhibits the growth of microorganisms but promotes that of salmonellae (selective enrichment), (Buffered Peptone Water Medium supplemented Novobiocin),

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

- inoculation in selective medium to presumptively confirm the presence of *Salmonella* sp. (Rappaport-Vassiliadis Medium, SMS Agar),
- culture on a second selective medium to definitely confirm the presence of *Salmonella* sp. (Hektoen Enteric Agar),
- confirmation of the presumptive *Salmonella* sp. with a biochemical assay (API 20E, MUCAP test).

***Clostridium perfringens* - principle of the method**

A thermal shock at 80°C for 10 minutes is performed to the samples in order to removal all the accompanying microbiota and the vegetative forms of *C. perfringens*. Then, the sample is added into an empty tube and SPS agar is poured. Tubes are incubated anaerobically at (44±1)°C for (24±1) h. The presence of spores *C. perfringens* is indicated by black colonies resulting from the precipitation of the sulphide produced by *C. perfringens* with the ferric citrate of the medium.

Total number of bacteria

The number of bacteria (cfu) in 1 g of the surplus sludge before and after hygienization by dry ice, presented graphically, was the arithmetic average of the three test series.

Physicochemical analysis

In the surplus sludge samples, before and after the process of disintegration by dry ice, the turbidity of supernatant liquor and COD_{Cr} value, expressing the release of organic matter, were determined. The physicochemical analyses were performed based on the methodology contained in the Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th Edition [35].

The presented here investigations were performed in 10 stages, arithmetic average and standard deviation was counts. Standard deviation was determination according to estimator of highest credibility in STATISTICA 6.0.

Results and discussion

Large amounts of sludge are produced in biological wastewater treatment plants. Since the sludge is highly contaminated, it has to undergo proper stabilization before it is disposed or utilized in an environmentally safe way. The paper presents a potential application of disintegration by freezing/thawing for sewage sludge (mainly surplus activated sludge) and sanitary condition enhancement.

The dry ice used caused the destruction of microorganisms, and thus contributed to a partial hygienization of surplus sludge, which is confirmed by the results of the microbiological analyzes (Figs. 1-3). In the surplus activated sludge not subjected to hygienization by dry ice, the total number of bacteria was 16 790 610 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 1) and for the sludge subject to hygienization the number was reduced:

- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25, by 8 576 238 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 1),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.5, by 10 489 285 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 1),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.75, by 11 739 829 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 1),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, by 12 684 266 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 1).

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

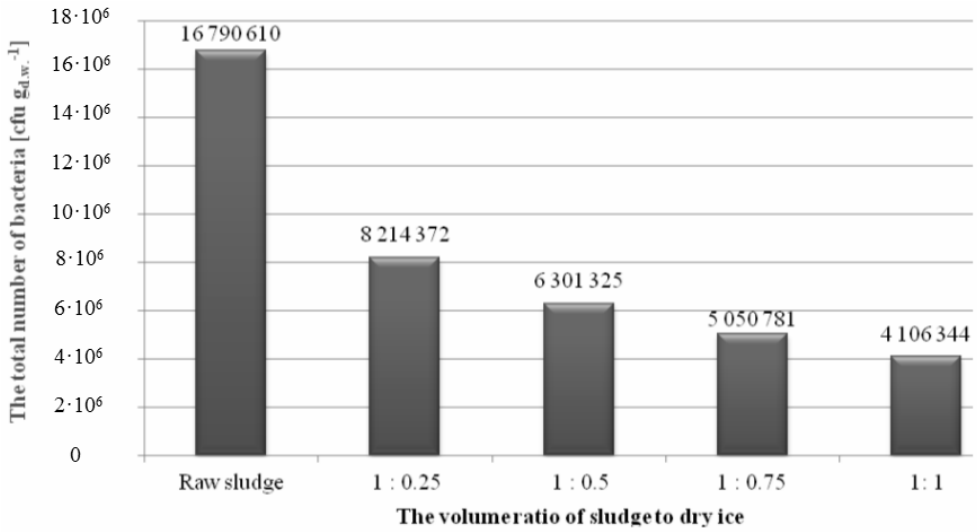


Fig. 1. The total number of bacteria (cfu) per 1 g of the surplus sludge depending on the volume ratio of sludge to dry ice

Sewage sludge commonly contains high amounts of human pathogenic bacteria excreted in feces and urine. The enteric pathogenic bacterial constituents include *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* (enterotoxigenic and enteropathogenic variants), *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp. and *Yersinia* spp.

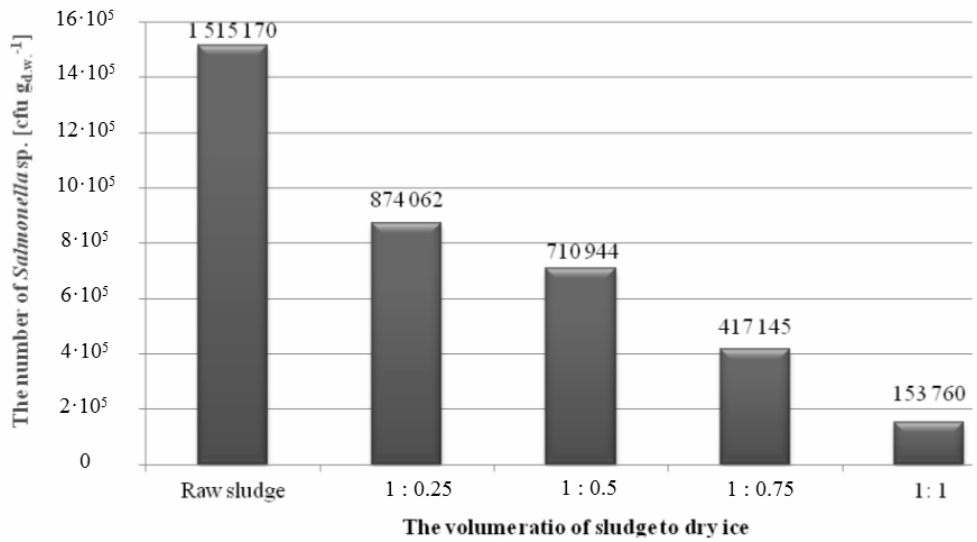


Fig. 2. The number of *Salmonella* sp. rods (cfu) per 1 g of the surplus sludge depending on the volume ratio of sludge to dry ice

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

Additionally, these organisms have a strong ability to persistently adapt to changes in the surrounding environment for survival and can be relatively resistant to commonly employed sludge stabilization techniques [36, 37]. The health risks related to these pathogens depends on the prior sludge treatments applied (pre-treatment processes), as well as their ability to maintain virulence properties during both storage and distribution on a field used for grazing or food harvesting purposes [38-41].

The sludge hygienization is one of the objectives and benefits of the treatment by freezing/thawing. The dry ice had a destructive effect on bacteria indicator of sanitary assessment of sewage sludge. The number of rods *Salmonella* in 1 g of the surplus sludge not subject to hygienization by dry ice amounted to 1 515 170 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 2), while after the process hygienization, this number decreased:

- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25, by 641 108 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 2),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.5, by 804 226 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 2),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.75, by 1 098 025 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 2),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, by 1 361 410 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 2).

A potential indicator of the sanitary quality of sewage sludge, which is mentioned in the literature [42] is *Clostridium perfringens.*

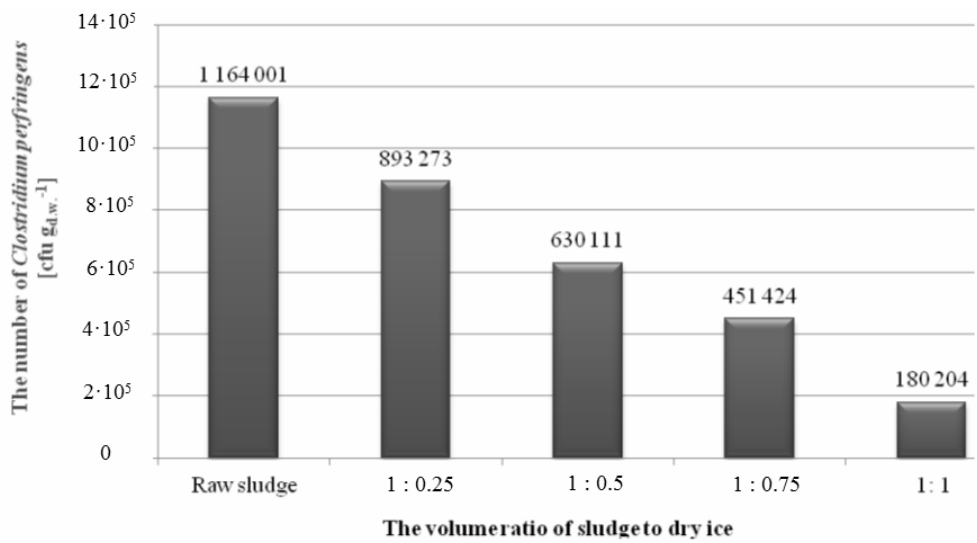


Fig. 3. The number of *Clostridium perfringens* rods (cfu) per 1 g of the surplus sludge depending on the volume ratio of sludge to dry ice

There was a gradual elimination of the *Clostridium perfringens* bacteria caused by the growth of the volume ratio of the sludge to dry ice. The number of *Clostridium perfringens* rods in the sludge not subject to hygienization by dry ice amounted to 1 164 001 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 3), while after the hygienization process, the number was reduced:

- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25, by 270 728 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 3),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.5, by 533 890 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 3),

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.75, by 712 577 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 3),
- for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 1, by 983 797 cfu $g_{d.w.}^{-1}$ (Fig. 3).

The efficiency of sludge hygienisation depended on for the volume ratio of sludge to dry ice.

Mechanical damages of cells and osmotic shock were the cause of death of microorganisms during freezing. The mechanical damages were caused by the formation of ice crystals in the surrounding environment of cell and inside the cell. Extracellular crystals increasing in the freezing process were destroying cells of microorganisms present among them [43]. The formation of intracellular crystals damage caused biomembrans damage and change of their properties leading to leakage of intracellular substances into the environment.

Several disintegration processes are developed: mechanical, thermal, chemical, biological. Although the methods are different in character, the aim of all of them is partial or complete bacteria cells disintegration, *ie* destruction and release of organic substances present inside cells to the liquid phase of the sludge.

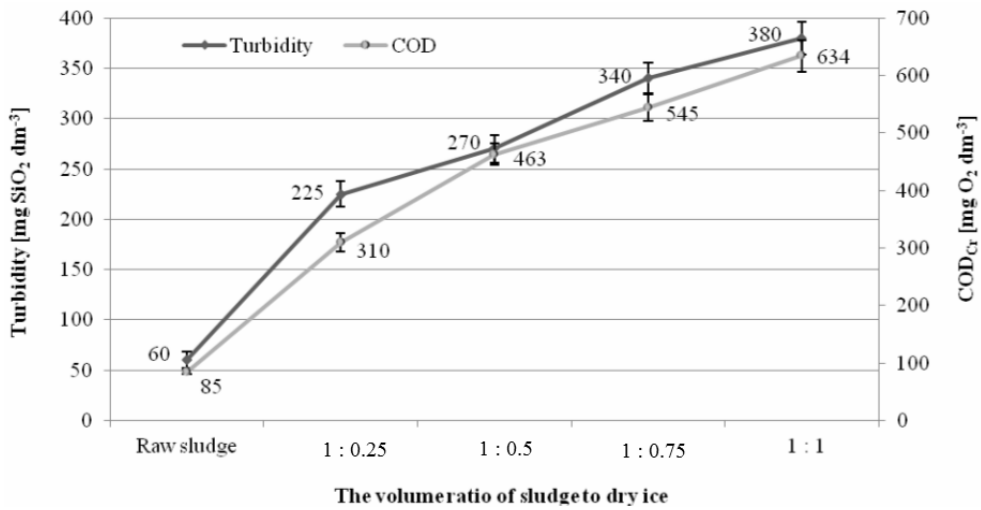


Fig. 4. The released organic matter (expressed as COD_{Cr}) and the turbidity of supernatant liquor before and after the process of disintegration by dry ice

The results of physicochemical analyzes confirmed the destructive action of dry ice on microorganisms. Release of organic matter expressed as an increase in soluble COD_{Cr} value was considered as a tool for measurement of decay bacteria effects (Fig. 4). According to the methodology used, the process of disintegration by dry ice was carried out for the volume ratio of sludge to dry ice 1 : 0.25; 1 : 0.5; 1 : 0.75; 1 : 1. The disintegration of the surplus sludge by dry ice resulted in the release of organic matter expressed with COD_{Cr} value (Fig. 4). The greater the dose of the dry ice used for the destruction of the sludge, the higher the value of COD_{Cr} in the supernatant liquor (Fig. 4). The value of COD_{Cr} in the supernatant liquor of the surplus sludge not subject to disintegration by dry ice was 85 mg O_2 dm^{-3} (Fig. 4), while after the disintegration for the volume ratio of the surplus

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

sludge to dry ice 1 : 1, the value of COD_{Cr} increased to 634 mg O_2 dm^{-3} (Fig. 4). It was over sevenfold increase of COD_{Cr}. Similar results using freezing method had Montusiewicz et al [44]. Destruction of the microbial cells by dry ice, as well as other methods of the disintegration, has a pronounced impact on released of organic matter to aqueous phase [9, 23, 45-46].

The microbiological destruction of the structure of flock by dry ice contributed to the increase in turbidity of the liquid phase of the sludge, mainly due to the release of intracellular and extracellular substance of polymers (Fig. 4). In the surplus sludge not subject to disintegration by dry ice, the turbidity of supernatant liquor was 60 mg SiO_2 dm^{-3} (Fig. 4), and after the process of destruction, for the volume ratio to dry ice 1: 1, was increased by 320 mg SiO_2 dm^{-3} (Fig. 4).

The obtained microbiological results, allow to conclude that hygienization by dry ice may become a new and favourable method of improving sewage sludges hygienization processes.

Conclusions

1. The destruction of the surplus sludge by dry ice carried out, helped to reduce the total number of bacteria and pathogenic bacteria, and thus the partial hygienization of the surplus sludge. The total number of bacteria in 1 g of the volume ratio of the sludge to dry ice 1 : 1 was reduced by 76%, the number of *Salmonella* sp. rods decreased by 90%, while the number of *Clostridium perfringens* rods decreased by 85%.
2. The disintegration of the surplus activated sludge by dry ice resulted in the release of organic matter into the liquid phase and the increase in turbidity of supernatant liquor. COD_{Cr} value increased by 549 mg O_2 dm^{-3}, and the turbidity of liquid by 320 mg SiO_2 dm^{-3}.

References

[1] Rozporządzenia Ministra Środowiska (DzU 2010, Nr 137, poz. 924).
[2] Bitton G. Wastewater Microbiology, Third Edition. New Jersey: John Wiley and Sons; 2005. DOI: 10.1002/0471717967.
[3] Bień J. Osady ściekowe. Teoria i praktyka. Częstochowa: Wyd. Politechniki Częstochowskiej; 2007.
[4] Virella G. Microbiology and Infectious Diseases. Baltimore: Williams & Wilkins a Waverly Company; 2000.
[5] Lunn AD, Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Vila J. Research Support, Non-U.S. Gov't. 2010;13:15-20. DOI: 10.2436/20.1501.01.107.
[6] Schlegel GH. Mikrobiologia ogólna. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2005.
[7] Sirous M, Namaki S, Mirshafiey A. PhD. Clostridia. J Chinese Clinic Medic. 2009;4:35-47.
[8] Wilson ChA, Novak JT. Water Res. 2009;43:4489-4498. DOI: 10.1016/j.watres.2009.07.022.
[9] Appels L, Degrève J, Van der Bruggen B, Van Impe J, Dewil R. Biores Technol. 2010;101:5743-5748. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.068.
[10] Barjenbruch M, Kopplow O. Adv Environ Res. 2003;7:715-720. DOI: 10.1016/S1093-0191(02)00032-1.
[11] Roman HJ, Burgess JE, Pletschke BI. Afric J Biotechnol. 2006;5:963-967. DOI: 10.5897/AJB06.154.
[12] Weemaes M, Grootaerd H, Simoens F, Verstraete W. Water Res. 2000;34:2330-2336. DOI: 10.1016/S0043-1354(99)00373-5.
[13] Campos JL, Otero L, Franco A, Mosquera-Corral A, Roca E. Biores Technol. 2009;100:1069-1073. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.07.056.
[14] Woodard SE, Wukasch RF. A hydrolysis/thickening/filtration process for the treatment of waste activated sludge. Water Sci Technol. 1994;30:29-38.
[15] Vlyssides AG, Karlis PK. Biores Technol. 2004;91:201-206. DOI: 10.1016/S0960-8524(03)00176-7.

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

[16] Gogate PR, Pandit AB. Hydrodynamic cavitation reactors: a state of the art review. Rev Chem Eng. 2001;17:7-85.
[17] Grübel K, Machnicka A, Suschka J. Scum hydrodynamic disintegration for waste water treatment efficiency upgrading. Ecol Chem Eng S. 2009;16:359-367.
[18] Machnicka A, Grübel K, Suschka J. The use hydrodynamic disintegration to accelerate anaerobic digestion of surplus activated sludge. Water Environ Res. 2009;81:1-7.
[19] Műller J. Disintegration as key-stop in sewage sludge treatment. Water Sci Technol. 2000;41:123-139.
[20] Bień J, Szparkowska J. Alkaliczne i ultradźwiękowe kondycjonowanie osadu nadmiernego przed procesem stabilizacji beztlenowej. GWiTS. 2004;9:316-320.
[21] Wang F, Lu S, Ji M. Ultrasonics. Sonochemistry. 2006;13:334-338. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2005.04.008.
[22] Antoniadis A, Poulios I, Nikolakaki E, Mantzavinos D. J Hazard Mater. 2007;146:492-495. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.04.065.
[23] Zhang G, Zhang P, Yang J, Chena Y. J Hazard Mater. 2007;145:515-519. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.01.133.
[24] Rusin A, Machnicka A. Kawitacja ultradźwiękowa w higienizacji osadu czynnego nadmiernego. GIG. 2011;3:73-80.
[25] Machnicka A, Grübel K, Suschka J. The use hydrodynamic disintegration as means to improve anaerobic digestion of activated sludge. Water SA. 2009;35:129-132.
[26] Machnicka A, Grübel K, Rusin A. Ecol Chem Eng S. 2012;19:415-421. DOI: 10.2478/v10216-011-0031-x.
[27] Radosz M. Badania nad możliwością zastosowania mikrofal do higienizacji osadów ściekowych. GWiTS. 2005;2:24-26.
[28] Janosz-Rajczyk M, Tomska A. Wpływ pola magnetycznego na proces oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego. GWiTS. 2006;2:28-31.
[29] Kennedy KJ, Thibault G, Droste RL. Microwave enhanced digestion of aerobic SBR sludge. Water SA. 2007;33:261-270.
[30] Dębowski M, Zieliński M. Możliwość zastosowania promieniowania mikrofalowego w procesach suszenia osadów powstających podczas oczyszczania ścieków. Woda Ścieki. 2009;1:8-11.
[31] Grübel K, Machnicka A. Oddziaływanie promieniowania mikrofalowego na osad czynny. Nauka Przyr Technol. 2011;5:67.
[32] Cotton A, Wilkinson G, Gaus PL. Chemia nieorganiczna. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 1995.
[33] Jean DS, Lee DJ, Chang CY. Adv Envir Res. 2001;5:145-150. DOI: 10.1016/S1093-0191(00)00052-6.
[34] 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.
[35] 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.
[36] Sahlström L. Biores Technol. 2003;87:161-166. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00168-2.
[37] Walczak M, Lalke-Porczyk E. Occurrence of bacteria salmonella sp. in sewage sludge used in agriculture. Environ Protect Eng. 2009;35:5-12.
[38] Hargreaves JC, Adl MS, Warman PR. Ecosyst Environ. 2008;123:1-14. DOI: 10.1016/j.agee.2007.07.004.
[39] Watanabe H, Kitamura T, Ochi S, Ozaki M. Water Sci Technol. 1997;36:25-32. DOI: 10.1016/S0273-1223(97)00503-9.
[40] Dumonten S, Dinel H, Baloda SB. Biological Agricult Horticult. 1999;16:409-430. DOI: 10.1080/01448765.1999.9755243.
[41] Czechowski F, Marcinkowski T. Water Res. 2006;40:1895-1905. DOI: 10.1016/j.watres.2006.02.023.
[42] Dudley DJ, Guentzel MN, Ibarra MJ, More BE, Sagik BP. Applied Environmental Microbiology. 1980;39:118-126. DOI: 0099-2240/80/01-0118/09$02.00/0.
[43] Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Warszawa: Wyd Nauk PWN; 2007.
[44] Montusiewicz A, Lebiocka M, Rożej A, Zacharska E, Pawłowski L. Biores Technol. 2010;101:3466-3473. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.125.
[45] Grűbel K, Machnicka A. J Environ Sci Health A - Toxic/Hazard Subst Environ Eng. 2014;49:101-107. DOI: 10.1080/10934529.2013.824738.
[46] Woon-Ji Pa, Johng-Hwa A. Environ Eng Res. 2011;16:103-109. DOI: 10.4491/eer.2011.16.2.103.

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

HIGIENIZACJA OSADU NADMIERNEGO SUCHYM LODEM

Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej
Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska
Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej

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 laseczek *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 SiO_2/dm^3 oraz wzrost wartości $ChZT_{Cr}$ o 549 mg O_2/dm^3 wyrażającej uwolnienie materii organicznej do fazy płynnej.

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

- 10.1515/eces-2014-0047
Downloaded from PubFactory at 07/23/2016 03:57:30PM
via free access

[5A]

Nowicka E., Machnicka A. (2014) Wpływ dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem na uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej. Gaz Woda i Technika Sanitarna. 8, 307 – 310.

Wpływ dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem na uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej

Effect of surplus sludge disintegration by dry ice on the release of organic and inorganic matter

Ewelina Nowicka, Alicja Machnicka*)

Słowa kluczowe: *suchy lód, osad nadmierny, $ChZT_{Cr}$, stopień dezintegracji*

Streszczenie

Jedną z możliwości poprawy skuteczności oczyszczania ścieków jest wprowadzenie dezintegracji powstających osadów. Podstawą skutecznego procesu dezintegracji jest zastosowanie fizycznych, chemicznych lub biologicznych metod niszczenia ściany komórkowej, w wyniku czego ulega ona fragmentacji, a składniki wewnątrzkomórkowe zostają uwolnione do otaczającej cieczy.

W pracy wykorzystano dezintegrację osadu nadmiernego suchym lodem oraz określono jego wpływ na uwalnianie materii organicznej i nieorganicznej. Zamrażanie/rozmrażanie osadu suchym lodem spowodowało wzrost wartości $ChZT_{Cr}$ o 549 mg O_2/dm^3, a stopień dezintegracji SD_{ChZT} wyniósł 32%. Destrukcja osadu uwolniła do cieczy nadosadowej proteiny. Stężenie białek dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 wzrosło o 191 mg/dm^3. Niszczenie struktury kłaczków uwolniło także substancje nieorganiczne, wyrażone zmianami stężeń azotu amonowego i fosforanów. Dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, stężenie azotu amonowego wzrosło z 1,3 mg N–NH_4^+/dm^3 do 21 mg N–NH_4^+/dm^3, a stężenie fosforanów wzrosło 5,2 mg PO_4^{3-}/dm^3 do 120 mg PO_4^{3-}/dm^3.

Keywords: *dry ice, surplus sludge, COD_{Cr}, degree of disintegration*

Abstract

One possibility to improve the efficiency of sewage treatment is the introduction of sludge disintegration. The basis for an effective process of disintegration is the use of physical, chemical and biological methods for the destruction of the cell wall, resulting in its fragmentation and release of intracellular components into the surrounding liquid.

In this work, the surplus sludge disintegration by means of dry ice, as well as determination of its effect on the release of organic and inorganic matter, was presented. Sludge freezing/thawing by dry ice resulted in an increase of about 549 mg COD O_2/dm^3 and the degree of disintegration SD_{COD} was 32%. Destruction of sediment released protein into the liquid supernatant. Protein concentrations for the volume ratio of dry ice to precipitate amounting to 1 : 1 increased by 191 mg/dm^3. The destruction of the flocs structure caused also a release of inorganic substances, expressed as changes in ammonium and phosphate concentrations. For the volume ratio of dry ice to precipitate 1 : 1, the concentration of ammonia nitrogen increased from 1.3 mg N–NH_4^+/dm^3 to 21 mg of N–NH_4^+/dm^3, and the phosphate concentration increased from 5.2 mg PO_4^{3-}/dm^3 to 120 mg PO_4^{3-}/dm^3.

Wstęp

W krajach Unii Europejskiej coraz większą uwagę zwraca się na problemy środowiska przyrodniczego, w tym na zagadnienia dotyczące przeróbki osadów ściekowych oraz ich zagospodarowanie [1].

Zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej dąży się do maksymalnego wykorzystania powstających osadów ściekowych, zarówno na etapie odzysku produktów i minimalizacji osadów jak i końcowego ich zagospodarowania. Rolnicze zagospodarowanie osadów jest poddawane restrykcyjnym przepisom a składowanie wymaga opracowania strategii, której celem jest ograniczenie ilości odpadów biodegradowalnych [2].

Dezintegracyjne metody przeróbki osadu dla poprawy jego podatności na biochemiczny rozkład należą obecnie do najbardziej dynamicznie rozwijających się technologii. Technika ta spostrzegana jest jako metoda rozwiązywania narastających problemów, związanych z przeróbką osadów ściekowych. Dotyczy to zwłaszcza możliwości zmniejszenia ilości osadów wyprowadzonych z oczyszczalni ścieków [3]. Dezintegracja jest procesem niszczenia struktur osadu [4, 5], polegającym na rozerwaniu połączeń między komórkami mikroorganizmów, zniszczeniu komórek wraz z uwolnieniem substancji organicznych, nieorganicznych i wewnątrzkomórkowych polimerów do fazy płynnej osadu [6]. Przeróbka osadów ściekowych wykorzystuje różne metody dezintegracji np. mechaniczne (sonifikacja, kawitacja hydrodynamiczna), chemiczne (alkalizacja, ozonowanie), biologiczne (enzymy) oraz termiczne (obróbka cieplna, zamrażanie/rozmrażanie) [7–10].

*) **Ewelina Nowicka, Alicja Machnicka** – Zakład Mikrobiologii Środowiskowej, Instytut Ochrony i Inżynierii Środowiska, Akademia Techniczno-Humanistyczna, 43-309 Bielsko-Biała, ul Willowa 2.
e-mail: amachnicka@ath.bielsko.pl, enowicka@ath.bielsko.pl

Proces zamrażania/rozmrażania często występuje w przyrodzie, co prowadzi do zmian własności środowiska [11] a wprowadzenie w ubiegłych latach termicznej przeróbki osadów miało na celu poprawę stopnia mineralizacji osadu a także poprawę jego odwadnialności [3, 12]. Odwadnianie osadów ściekowych za pomocą zamrażania/rozmrażania dokonuje się poprzez wydzielenie frakcji stałych i ciekłych, w trakcie powstawania kryształków lodu. Stwierdzono również, że mechanizm ten sprzyja przekształceniu kłaczków w postać bardziej zwartą, zbitą [13–15].

Zamrażanie/rozmrażanie z wykorzystaniem suchego lodu jest skuteczną techniką w odwadnianiu osadów ściekowych na co zwrócił uwagę Vesilind i Martel [16]. Suchy lód przekształca strukturę kłaczka w większe aglomeraty [14] i redukuje wodę związaną [17] dlatego proces zamrażania/rozmrażania suchym lodem cieszy się coraz większym zainteresowaniem [18–22].

Celem przeprowadzonych badań było przedstawienie możliwości wykorzystania destrukcyjnego działania suchego lodu na osad czynny nadmierny, przejawiającego się uwolnieniem materii organicznej i nieorganicznej do fazy płynnej osadu. Wzrost stężenia związków chemicznych w cieczy osadu, zwiększa pulę i dostępność materii organicznej dla drobnoustrojów uczestniczących w procesach technologicznych, a tym samym może służyć poprawie oczyszczania ścieków i przeróbki osadów.

Suchy lód czyli stały dwutlenek węgla to całkowicie naturalny produkt, produkowany w postaci granulatu przez sprężenie gazowego dwutlenku węgla do ciekłej postaci i usunięcie ciepła wytworzonego przy kompresji, a następnie szybkie rozprężanie. To rozprężanie i szybkie parowanie gazowego dwutlenku węgla schładza resztę płynu do temperatury topnienia, gdzie CO_2 zamarza w „śnieg", który przyjmuje formę kulek lub bryłek. Temperatura zamarzania CO_2 to -78,5°C [23].

Suchy lód sublimuje, czyli przechodzi z fazy stałej w fazę gazową w warunkach ciśnienia atmosferycznego z pominięciem fazy ciekłej. Ciepło sublimacji wynosi 573 kJ, co powoduje, że jest on ok. 3,3 razy efektywniejszym czynnikiem chłodniczym niż lód wodny (przy tej samej objętości). Ciężar właściwy „śniegu" mieści się w zakresie od 1,2 kg/dm^3 do 1,6 kg/dm^3, a jego twardość w skali Mohsa wynosi 2, co odpowiada twardości gipsu [14]. Stały dwutlenek węgla wytwarza bakteriostatyczną atmosferę, która poprawia jakość chłodzonych produktów zapobiegając ich utlenianiu. Jest to produkt niepalny, bezwonny i bez smaku, nietrujący, dopuszczony do kontaktu z artykułami spożywczymi. Posiada zastosowanie w cateringu, w chłodnictwie, w czyszczeniu wszelkiego typu maszyn oraz w laboratoriach do spowolnienia reakcji egzotermicznych [24], a obecnie także do przeróbki osadów ściekowych.

Przyczyną śmierci drobnoustrojów podczas mrożenia, w tym zamrażania suchym lodem, jest wzrost objętości zamarzającej wody w cytoplazmie, mechaniczne uszkodzenie ściany i błony komórkowej, szok osmotyczny oraz destrukcja organelli komórkowych. Mechaniczne uszkodzenia spowodowane są także tworzeniem się kryształów lodu w środowisku otaczającym komórki i w ich wnętrzu oraz częściową utratą wody hydratacyjnej białek, co prowadzi do zmian ich własności (denaturacja). Zwiększające się w procesie mrożenia zewnątrzkomórkowe kryształy niszczą występujące między nimi komórki drobnoustrojów [25, 26]. Tworzenie się kryształów międzykomórkowych powoduje uszkodzenia biomembran i zmianę ich właściwości, co prowadzi do wycieku substancji wewnątrzkomórkowych do środowiska.

Materiał i metoda

Materiałem doświadczalnym był osad czynny nadmierny pobierany z jednej oczyszczalni ścieków województwa śląskiego, która stosuje mechaniczne i biologiczne procesy zintegrowanego usuwania związków węgla, azotu i fosforu, zapewniające skuteczną eliminację zanieczyszczeń. W chwili obecnej oczyszczalnia posiada wydajność 90 tys. m^3/d, natomiast w okresie intensywnych opadów jest dostosowana do oczyszczania zwiększonej ilości ścieków w granicach 124 tys. m^3/d.

Do dezintegracji osadu nadmiernego zastosowano następujące stosunki objętościowe osadu nadmiernego do suchego lodu, tj.: 1: 0,25, 1: 0,5, 1: 0,75, 1: 1.

Analiza fizykochemiczna

W próbkach osadu nadmiernego przed i po procesie dezintegracji suchym lodem oznaczono parametry wskazujące na uwolnienie materii organicznej i nieorganicznej ($ChZT_{Cr}$, proteiny, stopień dezintegracji, objętość osadu, azot amonowy, fosforany, mętność). Oznaczenia fizykochemiczne wykonano w oparciu o metodykę zawartą w Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 19th Edition [27], wykorzystując Spektrofotmetr firmy DR LANGE Xion 500.

Analiza mikroskopowa

Zmiany biologiczne określono na podstawie zmian struktury kłaczków osadu nadmiernego wykorzystując mikroskop Nikon Alphaphot – 2 YS jasnego pola, sprzężony z kamerą Panasonic GP – KR 222. Uzyskane wyniki mikroskopowe analizowano stosując program obróbki komputerowej obrazu *Lucia* – ScMeas Version 4.51.

Wyniki i dyskusja

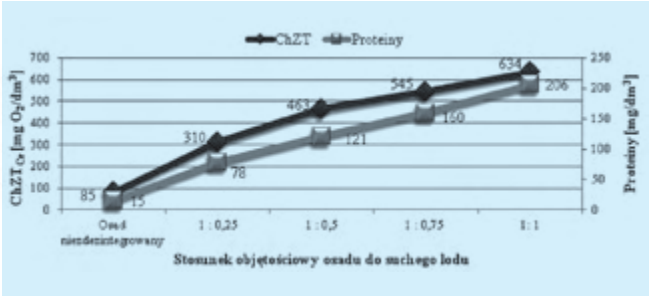
Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem powodowała uwolnienie materii organicznej (wyrażonej jako $ChZT_{Cr}$) w cieczy nadosadowej. Zmiany $ChZT_{Cr}$ związane były z rozerwaniem kłaczków osadu nadmiernego oraz komórek mikroorganizmów, co prowadziło do uwolnienia wewnątrzkomórkowych związków organicznych do fazy płynnej osadu.

Podczas dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem wykazano intensyfikację wzrostu $ChZT_{Cr}$ w zależności od stosunku objętościowego osadu do suchego lodu. Dezintegracja suchym lodem dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1:0,25 przyczyniła się do wzrostu $ChZT_{Cr}$ z wartości początkowej 85 mg O_2/dm^3 do 310 mg O_2/dm^3 (rys. 1.), a zwiększając dawkę suchego lodu do osadu w proporcji 1:1, $ChZT_{Cr}$ osiągnęło wartość 634 mg O_2/dm^3 (rys. 1.).

Wang i in. [28–30] porównali efekty sonolizy termicznej z efektami wymrażania w temperaturze -10°C oraz nadźwiękawiania. Stwierdzili, że wzrost ChZT rozpuszczonego był największy dla 40 minut nadźwiękawiania i wymrażania do -10°C, natomiast samo nadźwiękawianie okazało się nieskuteczne. W związku z czym można sądzić, że zamrażanie/rozmrażanie osadu istotnie wpływa na wprowadzenie do roztworu materii organicznej.

Analogicznie do przyrostu wartości $ChZT_{Cr}$ nastąpiło znaczące uwolnienie protein. Wzrost stężenia białek związany był również z destrukcyjnym działaniem suchego lodu na komórki drobnoustrojów oraz wprowadzeniem do roztworu enzymów i białek strukturalnych.

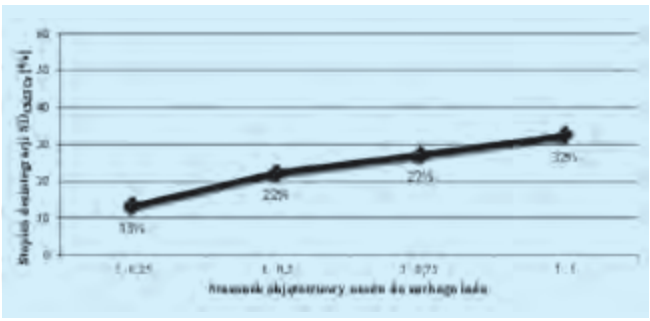
Do wykazania wpływu suchego lodu na uwolnienie białek z komórek mikroorganizmów wykorzystano metodę, służącą oznaczeniu stężeń protein stosowaną z powodzeniem przez innych autorów [31, 32]. Przy destrukcji osadu w stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1: 0,25, stężenie białek w fazie płynnej osadu wzrosło z 15 mg/dm^3 do 78 mg/dm^3 (rys. 1.). Kolejny wzrost objętości dawek suchego lodu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1: 0,5, 1: 0,75, 1: 1) powodował stopniowy wzrost stężenia protein w roztworze do wartości 206 mg/dm^3 (rys. 1.).



Rys. 1. Uwolnienie materii organicznej (wyrażonej jako $ChZT_{Cr}$) i wzrost stężenia protein przed i po procesie dezintegracji osadu suchym lodem

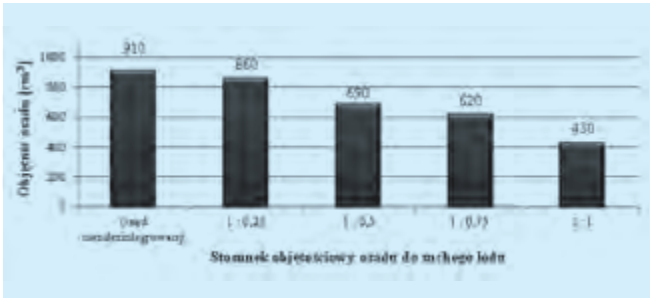
Skuteczność procesu dezintegracji osadu suchym lodem określono także za pomocą tzw. stopnia dezintegracji SD_{ChZT}, wykorzystując metodę Müllera [33].

W wyniku niszczącego działania suchego lodu na strukturę kłaczków osadu w stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1: 0,25, stopień dezintegracji SD_{ChZT} uległ zmianie z wartości początkowej 13% do 22% (rys. 2.). Dalszy wzrost objętości dawek suchego lodu (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1: 0,5, 1: 0,75, 1: 1) powodował intensyfikowanie stopnia dezintegracji do wartości 32% (rys. 2.).



Rys. 2. Zmiana stopnia dezintegracji SD_{ChZT}

Destrukcja suchym lodem kłaczków i mikroorganizmów osadu nadmiernego powodowała uwolnienie wody związanej co przyczyniło się do szybszego odwodnienia i lepszego zagęszczenia osadu. Objętość (1 dm^3) osadu nadmiernego nie poddanego dezintegracji suchym lodem po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa wyniosła 910 cm^3 (rys. 3.), jednak wraz ze wzrostem dawki suchego lodu, objętość ta ulegała zmniejszeniu. Dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1: 0,25, objętość osadu po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa wynosiła 860 cm^3 (rys. 3.) a dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1: 1, objętość osadu po 30 minutach zmniejszyła się do 430 cm^3 (rys. 3.). Z przeprowadzonych badań wynika, że zastosowanie suchego lodu powoduje zmiany we właściwościach sedymentacyjnych osadu w porównaniu do osadu niezdezintegrowanego.



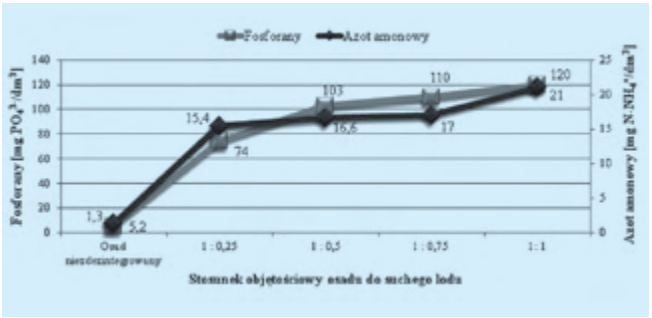
Rys. 3. Zmiany objętości osadu wywołane dezintegracją osadu suchym lodem

Na skutek niszczenia struktur komórek suchym lodem następowało uwolnienie enzymów znajdujących się w protoplaście mikroorganizmów, mających znaczenie w przemianach związków fosforu i azotu. Efektem działania hydrolitycznego katalizatorów komórkowych był rozkład organicznych związków fosforowych i azotowych, a co za tym idzie wzrost stężeń azotu amonowego i fosforanów w cieczy.

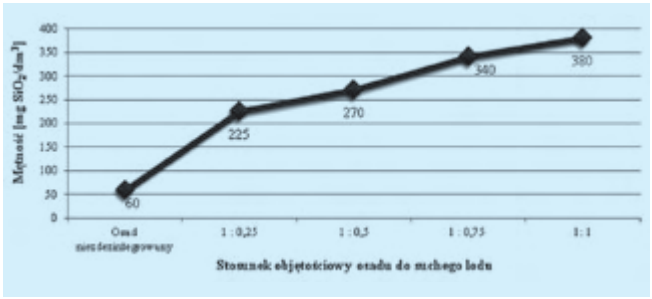
Działanie suchego lodu na osad powodowało stopniowy wzrost stężenia azotu amonowego w cieczy i przy stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1: 1 stężenie N – NH_4^+ wyniosło 21 mg N – NH_4^+/dm^3 (rys. 4.).

Proces zamrażania/rozmrażania osadu suchym lodem przyczynił się do wzrostu stężenia fosforanów z wartości początkowej 5,2 mg PO_4^{3-}/dm^3 do 120 mg PO_4^{3-}/dm^3 (stosunek objętościowy osadu do suchego lodu 1: 1) (rys. 4.).

Montusiewicz i in. [34, 35] ocenili wpływ dezintegracji osadów poprzez (stosując zmienną temperaturę) zamrażanie/rozmrażanie na właściwości osadów mieszanych (rzeczywistego i zużytego) z komunalnej oczyszczalni ścieków. Zbadali m.in. skutki procesu zamrażania/rozmraażania na jakość cieczy nadosadowej. Efekt wymrażania spowodował uwolnienie związków azotu i fosforu, lotnych kwasów tłuszczowych oraz spadek suchej masy całkowitej, co w pewnym stopniu koresponduje z uzyskanymi wynikami.



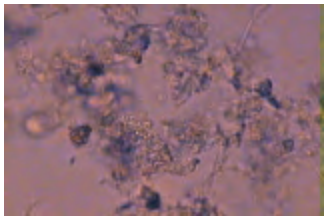
Rys. 4. Zmiany stężenia azotu amonowego i fosforanów przed i po dezintegracji osadu suchym lodem



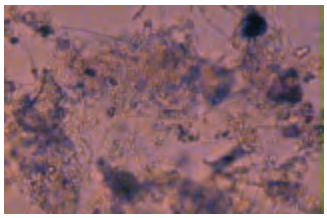
Rys. 5. Wzrost mętności cieczy nadosadowej przed i po procesie dezintegracji osadu suchym lodem

Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem doprowadziła do wzrostu mętności cieczy nadosadowej, spowodowanej wprowadzeniem do roztworu dodatkowego ładunku zawiesin i koloidów pochodzenia organicznego lub nieorganicznego na skutek destrukcji osadu. Mętność zwiększyła się z wartości początkowej 60 mg SiO_2/dm^3 dla osadu niezdezintegrowanego do wartości 380 mg SiO_2/dm^3 dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1: 1 (rys. 5.). Jej zmiany zależały od zastosowanego stosunku objętościowego osadu do suchego lodu (rys. 5.). Wzrost mętności spowodowany został rozpadem kłaczków osadu, rozpadem komórek mikroorganizmów i uwolnieniem materii organicznej do cieczy nadosadowej.

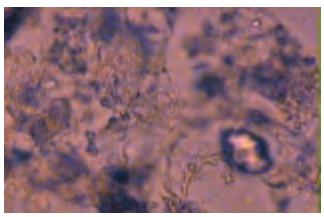
Potwierdzeniem dla uzyskanych wyników fizykochemicznych były przeprowadzone analizy mikroskopowe. Zmiany biologiczne w strukturze badanego osadu wykazały, że dezintegracja suchym lodem powodowała zniszczenie kłaczków osadu nadmiernego, zniszczenie uporządkowanych układów morfologicznych mikroorganizmów oraz przyczyniła się do ich znacznego rozdrobnienia i częściowej homogenizacji. Na fotografiach porównawczych (fot. 1–5) zaobserwowano wyraźne różnice morfologiczne w osadzie nadmiernym niepoddanym dezintegracji suchym lodem w stosunku do osadu poddawanego procesowi dezintegracji.



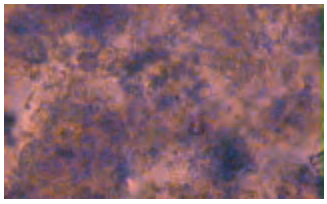
Fot. 1. Osad nadmierny niepoddany dezintegracji suchym lodem



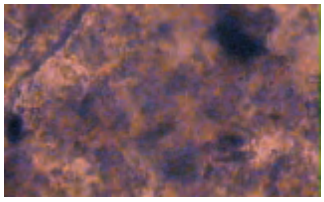
Fot. 2. Osad zdezintegrowany (stosunek osadu do suchego lodu 1: 0,25)



Fot. 3. Osad zdezintegrowany (stosunek osadu do suchego lodu 1: 0,5)



Fot. 4. Osad zdezintegrowany (stosunek osadu do suchego lodu 1: 0,75)



Fot. 5. Osad zdezintegrowany (stosunek osadu do suchego lodu 1: 1)

Wnioski

1. Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem powodowała uwolnienie materii organicznej wyrażonej wartością $ChZT_{Cr}$. Im większa była dawka suchego lodu w stosunku do osadu, tym wartość $ChZT_{Cr}$ w cieczy nadosadowej była wyższa. W cieczy nadosadowej osadu nadmiernego, niepoddanego dezintegracji suchym lodem wartość $ChZT_{Cr}$ wynosiła 85 mg O_2/dm^3, a po dezintegracji suchym lodem dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1: 1, wartość $ChZT_{Cr}$ wzrosła do 634 mg O_2/dm^3.
2. W wyniku dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem, nastąpiło zniszczenie struktur komórkowych mikroorganizmów, a tym samym wzrost stężenia białek. W osadzie nadmiernym niepoddanym dezintegracji suchym lodem, stężenie protein wynosiło 15 mg/dm^3, a po dezintegracji suchym lodem w stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1:1, stężenie białek wzrosło o 225 mg/dm^3.
3. Wraz ze wzrostem dawki suchego lodu, zwiększył się stopień dezintegracji SD_{ChZT} i dla stosunku objętościowego osadu nadmiernego do suchego lodu 1: 1 osiągnął 32%.
4. Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem powodowała jego zmiany w objętości. Objętość (1 dm^3) osadu nadmiernego niepoddanego dezintegracji suchym lodem po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa była na poziomie 910 cm^3. Natomiast objętość osadu poddanego dezintegracji suchym lodem przy stosunku objętościowym osadu do suchego lodu 1: 1, po 30 minutach sedymentacji w leju Imhoffa zmniejszyła się do 430 cm^3.
5. Suchy lód powodował uwolnienie związków nieorganicznych z osadu nadmiernego poddawanego dezintegracji. W osadzie nadmiernym niepoddanym dezintegracji suchym lodem, stężenie azotu amonowego wynosiło 1,3 mg N – NH_4^+/dm^3, a po destrukcji dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1: 1, stężenie N – NH_4^+ wzrosło do 21 mg/dm^3. W osadzie nadmiernym niepoddanym dezintegracji suchym lodem, stężenie fosforanów było na poziomie 5,2 mg PO_4^{3-}/dm^3, natomiast po zamrożeniu/rozmrożeniu suchym lodem dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1: 1, stężenie fosforanów zwiększyło się o 114,8 mg PO_4^{3-}/dm^3.
6. Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem powodowała wzrost mętności cieczy nadosadowej. Dla osadu nadmiernego niepoddanego dezintegracji suchym lodem, mętność cieczy wyrażona mg SiO_2/dm^3 wynosiła 60, natomiast po dezintegracji suchym lodem dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1: 1, mętność wzrosła o 320 mg SiO_2/dm^3.
7. Proces dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem stanowił przyczynę destrukcji kłaczków osadu, a także rozrywania i niszczenia mikroorganizmów. Mikroskopowo zaobserwowano wyraźne różnice w rozdrobnieniu kłaczków i ich częściową homogenizację w strukturze osadu nadmiernego poddanego procesowi dezintegracji suchym lodem w stosunku do osadu nadmiernego niepoddanego dezintegracji.

PIŚMIENNICTWO

[1] Zarzycki R. Problemy zagospodarowania osadów ściekowych. Łódź: PAN; 2001.

[2] Górski M. Zmiany w polskim prawodawstwie w kontekście integracji z Unią Europejską. Łódź: PAN; 2001.

[3] Zielewicz E. Dezintegracja ultradźwiękowa osadu nadmiernego w pozyskiwaniu lotnych kwasów tłuszczowych. Gliwice: Politechnika Śląska. Zeszyty Naukowe; 2007.

[4] Zhang G, Zhang P, Yang J, Chen Y. Journal of Hazardous Materials. 2007;145:515-519. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.01.133.

[5] Grübel K, Machnicka A. Oddziaływanie dezintegracji mikrofalowej na osad czynny. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. 2011;5:217-222.

[6] Bień JB, Malina G, Bień JD, Wolny L. Journal of Environmental Science and Health, Part A. 2004;39:939-949. DOI: 10.1081/ESE-120028404.

[7] Vesilind PA, Erdinclerm A. Effect of cell disruption on compatibility of biological sludge. Water Sci Technol. 2000;42:119-126.

[8] Saktaywin W, Tsuno H, Nagare H, Soyama T, Weerapakkaroon J. Water Res. 2005;39:902-910. DOI: 10.1016/j.watres.2004.11.035.

[9] Xue T, Huang X. Journal of Environmental Sci. 2007;19:1153-1158. DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60188-0.

[10] Jan TW, Adav SS, Lee DJ, Wu RM, Su A, Tay JH. Hydrogen fermentation and methane production from sludge with pretreatments. Energy Fuels. 2007;22:98-102.

[11] Eigenbrod KD. Effects of cyclic freezing and thawing on volume changes and permeability`s of soft fine-grained soils. Canadian geotechnical journal. 1996;33: 529–537.

[12] Martel CJ. Dewaterability of freeze/thaw conditioned sludges. Journal Water Pollut. Control Fed. 1989;61: 237–241.

[13] Chu CP, Feng WC, Chang BV, Chou C, Lee DJ. Reduction of microbial density level in wastewater activated sludge via freezing and thawing. Water Res. 1999;33:3532-3535.

[14] Jean DS, Lee DJ, Chang CY. Advances Environmental Res. 2001;5:145-50. DOI: 10.1016/S1093-0191(00)00052-6.

[15] Vesilind PA, Wallinmaa S, Martel CJ. Canadian Journal of Civil Engineering. 1991;18:1078-1083. DOI: 10.1139/l91-130.

[16] Vesilind PA, Martel CJ. Journal of Environmental Engineering. 1990;116:854–862. DOI: 10.1061/(ASCE)0733-9372(1990)116:5(854).

[17] Lee DJ, Hsu YH. Environmental Science Tech. 1994;28:1444-1449. DOI: 10.1021/es00057a011.

[18] Hung WT, Chang IL, Lin WW, Lee DJ. Unidirectional freezing of waste activated sludge: effects of freezing speed. Environmental Science Tech. 1996;30:2391–2396.

[19] Hung WT, Feng WH, Tsai IH, Lee DJ, Hong SG. Unidirectional freezing of waste activated sludge: radial freezing vs. vertical freezing. Water Res. 1997;31:2219-2228.

[20] Chu CP, Feng WH, Tsai YH, Lee DJ. Environmental Science Tech. 1997;31:1512-1517. DOI: 35400006533971.0400.

[21] Jean DS, Lee DJ. Colloids and Surfaces A. 1999;162:285-288. DOI: 10.1016/S0927-7757(99)00238-1.

[22] Parker PJ, Collins AG. Water Res. 1999;33:2239-2246. DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00449-7.

[23] Kozłowski Z, Gutowski R. Chemia nieorganiczna dla techników chemicznych. Warszawa: Wyd Szkol i Pedag; 1996.

[24] Cotton A, Wilkinson G, Gaus PL. Chemia nieorganiczna. Warszawa: PWN; 1995.

[25] Bollag DH, Edelstein SJ. Protein Methods. New York: Wiley&Liss; 1992.

[26] Libudzisz Z, Kowal K, Żakowska Z. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania. Warszawa: PWN; 2007.

[27] 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.

[28] Wang Q, Kuninobu M, Kakimoto K, Ogawa H, Kato Y. Bioresource Technology. 1999;68:309-313. DOI: 10.1016/S0960-8524(98)00155-2.

[29] Randall C. W., Ali Khan M. Z. and Stephens N. T. Waste activated sludge conditioning by direct slurry freezing. Water Res. 1975;9:917.

[30] Hong S. G., Young J. D., Chen G. W., Chang I. L., Hung W. T. and Lee D. J. Freeze/thaw treatment on waste activated sludge: a FTIR spectroscopic study. J. Environ. Sci. Health A. 199530(8), 1717.

[31] Zaia DAM, Verri JrAA, Zaia CTBV. Microchemical Journal. 2000;64:235-239. DOI: 10.1016/S0026-265X(00)00017-5.

[32] Raunkjćr K, Hvitved-Jacobsen T, Nielsen PH. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. Water Res. 1994;2:251–262.

[33] Müller J. Disintegration as key-stop in sewage sludge treatment. Water Sci Technol. 2000, 41: 123–139.

[34] Montusiewicz A, Lebiocka M, Rożej A, Zacharska E, Pawłowski L. Bioresource Technology. 2010,101:3466-3473. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.125.

[35] Kai Hu, Jun-Qiu Jiang, Qing-Liang Zhao, Duu-Jong Lee, Kun Wang, Wei Qiu. Conditioning of wastewater sludge using freezing and thawing: Role of curing. Water Research. 2011;45:5969–597.

[6A]

Nowicka E., Machnicka A., Grübel K. (2014) Wykorzystanie suchego lodu do dezintegracji osadu czynnego nadmiernego w celu intensyfikacji procesu fermentacji metanowej. Proceedings of ECOpole. 8(1), 239 – 247. DOI: 10.2429/proc.2014.8(1)031.

DOI: 10.2429/proc.2014.8(1)031 2014;8(1)

Ewelina NOWICKA[1], Alicja MACHNICKA[1] i Klaudiusz GRŰBEL[1]

WYKORZYSTANIE SUCHEGO LODU DO DEZINTEGRACJI OSADU CZYNNEGO NADMIERNEGO W CELU INTENSYFIKACJI PROCESU FERMENTACJI METANOWEJ

IMPROVING OF ANAEROBIC DIGESTION BY DRY ICE DISINTEGRATION OF SURPLUS ACTIVATED SLUDGE

Abstrakt: Jednym z podstawowych problemów występujących w układach przeróbki osadów ściekowych jest zwiększenie dostępności i podatności substancji organicznych na biodegradację, co można osiągnąć poprzez dezintegrację osadu. W pracy wykorzystano dezintegrację osadu nadmiernego suchym lodem oraz określono jej wpływ na uwalnianie materii organicznej i na efektywność fermentacji metanowej wyrażonej produkcją biogazu. Zamrażanie/rozmrażanie osadu suchym lodem powodowało wzrost wartości $ChZT_{Cr}$ o 520 mg O_2/dm^3, a stopień dezintegracji SD wyniósł 49%. W wyniku destrukcji osadu za pomocą suchego lodu do cieczy nadosadowej zostały również uwolnione proteiny oraz węglowodany, co świadczyło o skuteczności procesu. Stężenia tych parametrów wyniosły odpowiednio 265 i 53 mg/dm^3. Poddanie fermentacji mieszanki: osadu zdezintegrowanego w objętości 30%, osadu niezdezintegrowanego w objętości 40 i 30% osadu przefermentowanego spowodowało wzrost wydajności produkcji biogazu o 49%.

Słowa kluczowe: suchy lód, $ChZT_{Cr}$, proteiny, węglowodany, fermentacja metanowa, biogaz

Wstęp

Osady powstające w procesie oczyszczania ścieków muszą być poddane procesom przeróbki, mającym na celu zmniejszenie ich objętości oraz pozbawienie szkodliwego oddziaływania na środowisko. Do procesów umożliwiających takie działanie zalicza się głównie: obróbkę cieplną, odwadnianie, stabilizację tlenową oraz fermentację metanową.

Stabilizacja beztlenowa jest powszechną metodą stosowaną w utylizacji osadów ściekowych, przebiegającą w czterech fazach, tj.: hydrolizy - enzymy zewnątrzkomórkowe rozkładają nierozpuszczalne związki organiczne do związków rozpuszczalnych w wodzie; acidogenezy - bakterie kwasowe rozkładają powstałe związki rozpuszczalne do prostych kwasów organicznych, wodoru i ditlenku węgla; acetogenezy - rozkład związków organicznych do kwasu octowego; metanogenezy - rozkład octanów i kwasu octowego do metanu i ditlenku węgla. Produktem gazowym fermentacji jest biogaz, składający się z metanu w 55-75% i ditlenku węgla w 24-25% [1, 2].

Faza hydrolityczna jest etapem limitującym fermentację beztlenową, przez co dostarczenie na tym etapie łatwo rozkładalnych produktów wpływa na przyspieszenie tej fazy oraz intensyfikuje cały proces fermentacji. Otrzymanie i dostarczenie łatwo przyswajalnych związków osiągnąć można poprzez zastosowanie procesu dezintegracji. Do obecnie stosowanych metod dezintegracji należą: metody fizyczne [3-7], chemiczne [8-10] lub biologiczne [11-13] oraz termiczne [14-16]. Techniki te są różne, ale ich wspólnym celem jest częściowe lub całkowite rozerwanie komórek mikroorganizmów, tzn.

[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'13, Jarnołtówek, 23-26.10.2013

zniszczenie ściany i/lub błony komórkowej bakterii, uwolnienie substancji wewnątrzkomórkowych do cieczy nadosadowej oraz zapoczątkowanie i zwiększenie stopnia biologicznej degradacji.

Jedną z metod destrukcji mikrobiologicznej struktury kłaczków jest zamrażanie/rozmrażanie. Proces ten powszechnie występuje w przyrodzie i polega na przejściu fazowym substancji ciekłej w stan stały. Podstawowym następstwem jakościowym zamarzania i krystalizacji jest zmiana struktury substancji ulegającej zamrożeniu, a także ubytek masy w wyniku parowania, czego skutkiem jest zmiana właściwości zamrażanego medium. W oczyszczalniach komunalnych proces ten wykorzystywany jest m.in. do odwadniania osadów ściekowych [17], który dokonuje się poprzez wydzielenie frakcji stałych i ciekłych w trakcie powstawania kryształków lodu. Stwierdzono również, że mechanizm zamrażania sprzyja przekształceniu kłaczków w postać bardziej zwartą, zbitą [18-20].

Podstawowe mechanizmy zamrażania/rozmrażania osadów ściekowych, stosowane jako metoda kondycjonowania osadów przed beztlenową stabilizacją, budzą coraz większe zainteresowanie ze względu na możliwość redukcji bakterii chorobotwórczych, zmniejszenia biomasy osadów oraz zwiększenia produkcji biogazu [21, 22].

Aspektem zamrażania i rozmrażania osadów ściekowych jest rodzaj czynnika wymrażającego. Poszukuje się nowych metod, pozwalających uzyskać wysoki stopień dezintegracji przy zminimalizowaniu nakładów energetycznych, co pozwoliłoby włączyć je w ciąg technologii oczyszczania ścieków. Na tej podstawie nasunęło się rozwiązanie, dotyczące zastosowania suchego lodu jako innowacyjnej metody udoskonalenia procesu dezintegracji termicznej i fermentacji metanowej osadu czynnego nadmiernego.

Stały ditlenek węgla, czyli suchy lód, to naturalny produkt, powstający w wyniku rozprężania ciekłego ditlenku węgla. Suchy lód jest niestabilny w temperaturze powyżej minus 78,5°C, a podczas ogrzewania nie topi się, lecz sublimuje bezpośrednio do postaci gazowej CO_2 [23]. Jest nietoksyczny, niepalny, bezwodny oraz nie posiada smaku ani zapachu. Jest wykorzystywany m.in. w chłodnictwie jako dodatek do żywności (zapobiegając ich utlenianiu) według Dyrektywy Europejskiej 96/77/EC, a także w pracach naukowo-badawczych jako katalizator lub składnik mieszanek o niskich temperaturach [24, 25].

Materiał i metoda

Materiałem doświadczalnym był osad czynny nadmierny pobierany z oczyszczalni ścieków, stosującej zaawansowane procesy biologicznego oczyszczania ścieków, polegające na równoczesnym usuwaniu związków organicznych oraz związków azotu i fosforu. W chwili obecnej oczyszczalnia posiada wydajność 90 tys. m^3/d, natomiast w okresie intensywnych opadów jest dostosowana do oczyszczania zwiększonej ilości ścieków w granicach 124 tys. m^3/d, czas zatrzymania ścieków ok. 14 dni, a stężenie osadu czynnego w bioreaktorze 4320-4640 mg/dm^3.

Termiczna dezintegracja

Do dezintegracji osadu nadmiernego zastosowano suchy lód w stosunkach objętościowych do osadu czynnego: 0,25:1; 0,5:1; 0,75:1; 1:1.

Analiza chemiczna

Próby osadu czynnego nadmiernego niepoddanego procesowi dezintegracji termicznej jak też po procesie analizowano chemicznie, wykonując oznaczenia takich parametrów, jak: wartość chemicznego zapotrzebowania na tlen metodą dwuchromianową ($ChZT_{Cr}$) oraz stężenia protein i węglowodanów. Analizy $ChZT_{Cr}$ i protein zrealizowano w oparciu o metodykę zawartą w Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 20th Edition [26], a węglowodanów według metody Anthrona [27]. W badaniach wykorzystano Spektrofotometr firmy DR LANGE Xion 500.

Stopień dezintegracji

W celu uzyskania stopnia rozpadu kłaczków osadu Kunz i Wagner [28] zaproponowali współczynnik określany jako stopień rozdrobnienia (dezintegracji) (SD). Następnie współczynnik ten został zmodyfikowany przez Müllera [29] i w niniejszym opracowaniu został on zaprezentowany w następujący sposób [30]:

$$SD = [(ChZT_{Cr1} - ChZT_{Cr2}) / (ChZT_{Cr3} - ChZT_{Cr2})] \cdot 100(\%) \quad (1)$$

gdzie: SD - stopień dezintegracji, $ChZT_{Cr1}$ - stężenie w próbce zdezintegrowanej termicznie, $ChZT_{Cr2}$ - stężenie w próbce rzeczywistej, $ChZT_{Cr3}$ - stężenie w próbce po chemicznej dezintegracji.

Chemiczną dezintegrację próbki przeprowadzono, dodając NaOH 1M do badanego medium w stosunku 1:2. Po dodaniu wodorotlenku sodu próbkę podgrzewano przez 10 minut w temperaturze 90ºC.

Fermentacja metanowa

Analiza wpływu procesu dezintegracji termicznej suchym lodem na efekt fermentacji beztlenowej osadu czynnego nadmiernego prowadzona była z wykorzystaniem termostatowych (35 ± 1ºC) komór doświadczalnych. Komory wypełniono mieszaniną osadu niezdezintegrowanego i przefermentowanego oraz z udziałem objętościowym (20, 30, 40, 50 i 70%) osadu poddanego dezintegracji suchym lodem (dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu 1:1), tj.:

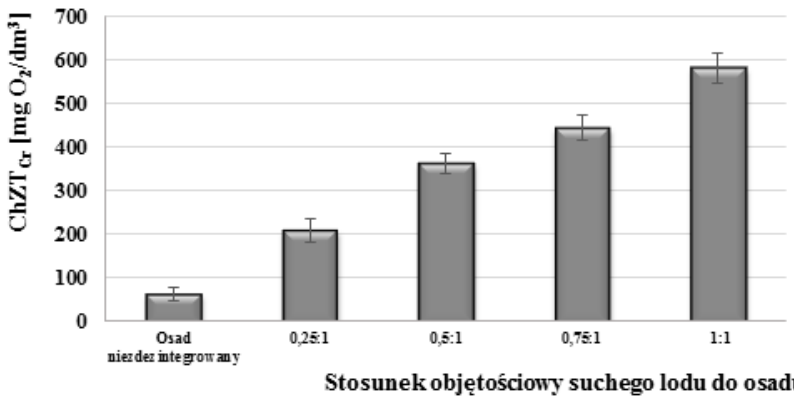
Fermenter 1 - 70% osad niedezintegrowany (ON) + 30% osad przefermentowany jako inoculum (OP),
Fermenter 2 - 50%ON + 30%OP + 20% osad dezintegrowany suchym lodem (ODSL),
Fermenter 3 - 40%ON + 30%OP + 30%ODSL,
Fermenter 4 - 30%ON + 30%OP + 40%ODSL,
Fermenter 5 - 20%ON + 30%OP + 50%ODSL,
Fermenter 6 - 30%OP + 70%ODSL.

W trakcie fermentacji systematycznie mierzono objętość powstającego biogazu.

Celem przeprowadzonych badań jest przedstawienie możliwości wykorzystania destrukcyjnego działania suchego lodu na osad czynny nadmierny oraz wykazanie jego wpływu na poprawę efektywności fermentacji metanowej, objawiającej się produkcją biogazu. Przedstawione wyniki zrealizowano w 5 powtórzeniach, z których wyliczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe (program STATISTICA 6.0).

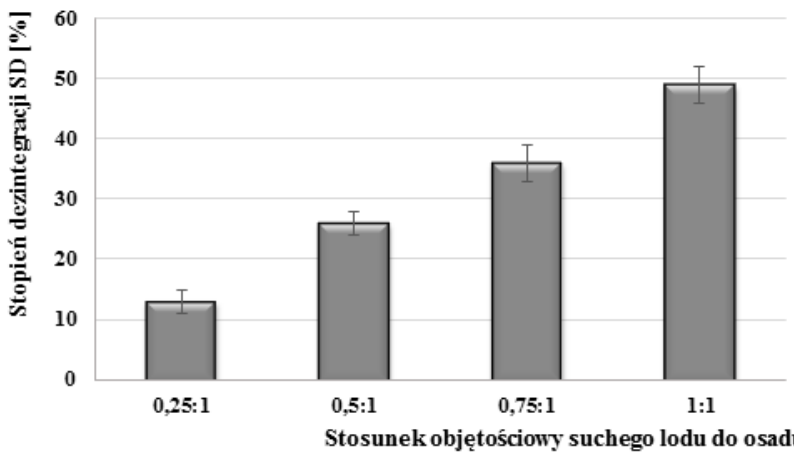
Wyniki i dyskusja

Zniszczenie komórek bakteryjnych w wyniku działania suchym lodem doprowadziło do wprowadzenia do roztworu związków organicznych mikroorganizmów, których uwalnianie wykazano na podstawie zmian wartości $ChZT_{Cr}$ w fazie płynnej osadu. Podczas destrukcji osadu nadmiernego zaobserwowano zwiększające się wartości $ChZT_{Cr}$ w cieczy nadosadowej w zależności od dawki objętościowej suchego lodu do osadu. Dezintegracja termiczna dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu 0,25:1 doprowadziła do wzrostu $ChZT_{Cr}$ z wartości początkowej 63 mg O_2/dm^3 do wartości 210 mg O_2/dm^3. Dalsze zwiększanie dawki suchego lodu do objętości osadu aż do stosunku 1:1 spowodowało zwiększenie wartość $ChZT_{Cr}$ 9-krotnie (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ dawki objętościowej suchego lodu na zmianę wartości $ChZT_{Cr}$ w fazie płynnej osadu czynnego nadmiernego

Fig. 1. Changes of value of COD in supernatant of surplus activated sludge with increase of volume of dry ice



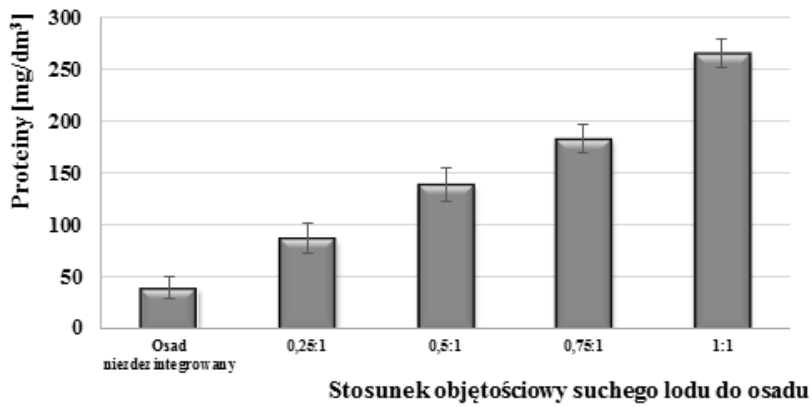
Rys. 2. Zmiana stopnia dezintegracji SD osadu czynnego nadmiernego

Fig. 2. Changes of degree of disintegration with increase of volume of dry ice

Dezintegrując termicznie osad nadmierny za pomocą suchego lodu, następowało uwalnianie materii organicznej, co zostało wyrażone zmianą wartości ChZT w cieczy nadosadowej (rys. 1). Zgodnie z oczekiwaniami, wraz ze wzrostem dawki zestalonego CO_2 wzrastał stopień dezintegracji (SD) prób wyliczony według zależności (1).

Na rysunku 2 przedstawiono zmianę stopnia dezintegracji, gdzie w wyniku niszczącego działania suchego lodu na strukturę kłaczków osadu w stosunku objętościowym suchego lodu do osadu 0,25:1 stopień dezintegracji SD uległ zwiększeniu z wartości początkowej 13 do 26% (rys. 2). Dalszy wzrost objętości dawek suchego lodu (0,5:1; 0,75:1; 1:1) był przyczyną podwyższenia SD do wartości 49% (rys. 2).

Analogicznie do przyrostu wartości $ChZT_{Cr}$ nastąpiło znaczące uwolnienie protein (rys. 3). Wzrost stężenia białek związany był z destrukcyjnym działaniem suchego lodu na komórki drobnoustrojów oraz wprowadzeniem do roztworu enzymów i białek strukturalnych. Przy dezintegracji osadu w stosunku objętościowym suchego lodu do osadu 0,25:1 stężenie białek w fazie płynnej osadu wzrosło z 39 do 87 mg/dm^3 (rys. 3). Zwiększając objętość suchego lodu do osadu w stosunku 1:1, stężenie protein osiągnęło wartość 265 mg/dm^3 (rys. 3).



Rys. 3. Wpływ dawki objętościowej suchego lodu na zmianę stężenia protein w cieczy nadosadowej

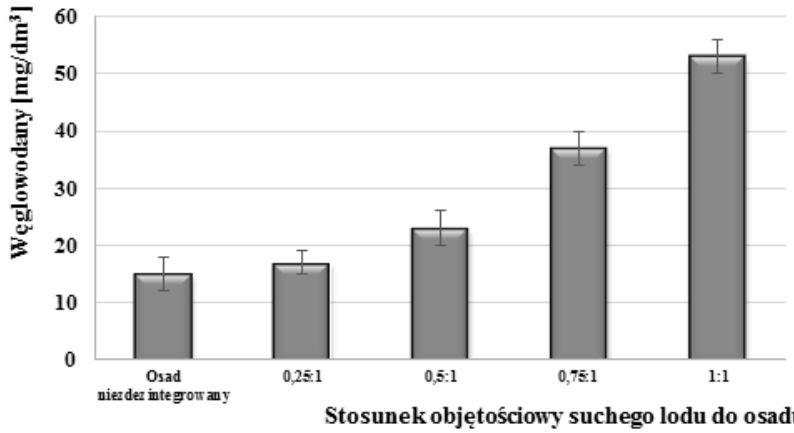
Fig. 3. Changes of proteins concentrations in supernatant of surplus activated sludge with increase of volume of dry ice

Skuteczność procesu destrukcji została wyrażona również poprzez określenie stężenia węglowodanów w fazie płynnej osadu poddanego zamrażaniu/rozmrażaniu. Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem doprowadziła do wzrostu stężenia węglowodanów w fazie płynnej osadu z wartości początkowej 15 mg/dm^3 dla osadu niezdezintegrowanego do wartości 53 mg/dm^3 dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu 1:1 (rys. 4). Tak więc, rozpad kłaczków osadu i komórek mikroorganizmów skutkował uwolnieniem materii organicznej do cieczy nadosadowej, wyrażonej wzrostem wartości $ChZT_{Cr}$, stężeniem protein i węglowodanów (rys. 1, 3 i 4).

Miarą efektywności procesu fermentacji osadów jest m.in. produkcja biogazu.

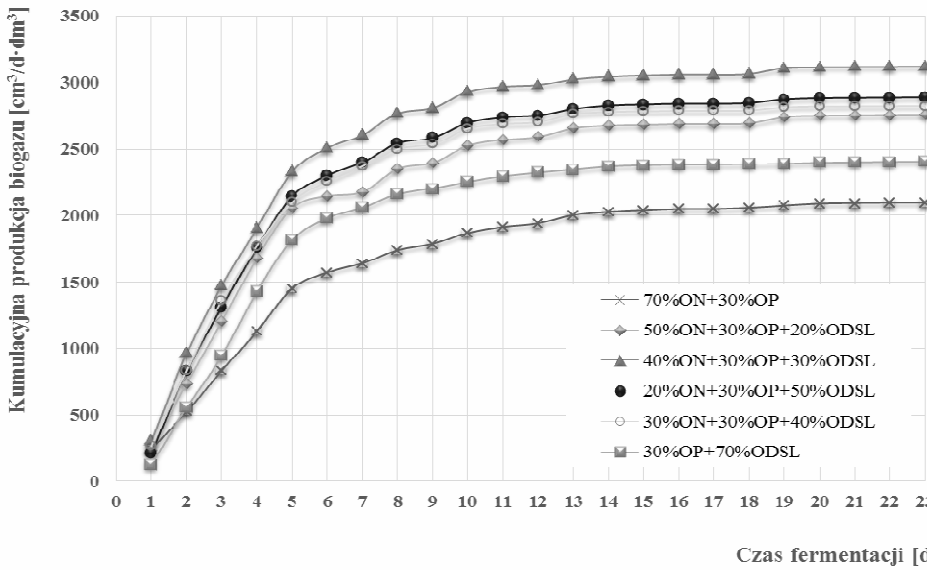
Zrealizowane badania zmierzały do oceny intensyfikacji procesu stabilizacji beztlenowej osadu czynnego nadmiernego przez dodatek osadu niezdezintegrowanego,

osadu przefermentowanego (30% objętościowo w każdej próbce) oraz osadu poddanego dezintegracji suchym lodem (20, 30, 40, 50 i 70%) dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu 1:1.



Rys. 4. Zmiana stężenia węglowodanów przed i po dezintegracji termicznej osadu czynnego nadmiernego

Fig. 4. Changes of carbohydrates concentrations in supernatant of surplus activated sludge with increase of volume of dry ice



Rys. 5. Wpływ udziału objętościowego osadu czynnego nadmiernego poddanego dezintegracji termicznej na produkcję biogazu

Fig. 5. The influence of the volume of disintegrated surplus activated sludge by dry ice on biogas production

Rysunek 5 przedstawia zmiany produkcji biogazu po 23 dobach fermentacji. Porównując otrzymane wyniki, można stwierdzić, że w przypadku fermentacji osadu zdezintegrowanego w objętości 70% nastąpiła mniejsza produkcja biogazu (2408 $cm^3/d \cdot dm^3$) aniżeli w próbach z udziałem 40% (2826 $cm^3/d \cdot dm^3$) i 50% (2890 $cm^3/d \cdot dm^3$) objętościowo osadu nadmiernego po termicznej destrukcji. Niska produkcja biogazu spowodowana jest najprawdopodobniej zbyt wysokim ładunkiem materii organicznej wprowadzonym do komory fermentacyjnej. Próba z udziałem 30% objętościowo wyprodukowała 3124 $cm^3/d \cdot dm^3$ biogazu, co daje 49% wzrost w stosunku do próby porównawczej (rys. 5).

Udział objętościowy zdezintegrowanego osadu czynnego nadmiernego wskutek dezintegracji suchym lodem przyczynił się do zdecydowanie intensywniejszej produkcji biogazu w porównaniu do produkcji biogazu z próby rzeczywistej. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że wprowadzenie do reaktora fermentacyjnego niewielkiej części zdezintegrowanego zestalonym ditlenkiem węgla osadu nadmiernego może w znaczący sposób zintensyfikować i podnieść efektywność procesu stabilizacji beztlenowej.

Wnioski

1. Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem powodowała uwolnienie materii organicznej wyrażonej wartością $ChZT_{Cr}$. W cieczy nadosadowej osadu nadmiernego, niepoddanego dezintegracji suchym lodem, wartość $ChZT_{Cr}$ wynosiła 63 mg O_2/dm^3, a po dezintegracji suchym lodem dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu 1:1 wartość $ChZT_{Cr}$ wzrosła o 520 mg O_2/dm^3.
2. Wraz ze wzrostem dawki suchego lodu zwiększył się stopień dezintegracji SD i dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu nadmiernego 1:1 osiągnął 49%.
3. W wyniku dezintegracji osadu nadmiernego suchym lodem nastąpiło zniszczenie struktur komórkowych mikroorganizmów, a tym samym wzrost stężenia białek i węglowodanów w cieczy nadosadowej. Dla stosunku objętościowego suchego lodu do osadu 1:1 stężenie białek wyniosło 265 mg/dm^3, a stężenie węglowodanów osiągnęło wartość 53 mg/dm^3.
4. Z przeprowadzonych badań wynika, że najkorzystniejszą dawką objętościową okazała się mieszanina z udziałem 30% osadu dezintegrowanego termicznie. Produkcja biogazu w tym przypadku była o 49% wyższa w stosunku do próby porównawczej, co świadczy o skuteczności zastosowanej metody dezintegracji.

Literatura

[1] Worwąg M, Brzeska K, Zawieja I, Bień J. Stabilizacja beztlenowa osadów ściekowych pochodzących z przemysłu celulozowo-papierniczego. Proc ECOpole. 2008;2:493-498.
[2] Miksch K, Sikora J. Biotechnologia ścieków. Gliwice: Wyd Nauk PWN; 2010.
[3] Wett B, Phothilangka P, Eladawy A. Waste Manage. 2010;30:1057-1062. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.12.011.
[4] Barjenbruch M, Kopplow O. Adv Environ Res. 2003;7:715-720. DOI: 10.1016/S1093-0191(02)00032-1.
[5] Tiehm A, Nickel K, Zellhorn M, Neis U. Water Res. 2001; 35:2003-2009. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00468-1.
[6] Panyue Z, Guangming Z, Wei W. Bioresour Technol. 2007;98:207-210. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.12.002.

[7] Dong-Hoon K, Emma J, Sae-Eun O, Hang-Sik S. Water Res. 2010;44:3093-3100. DOI: 10.1016/j.watres.2010.02.032.
[8] Young-Khee O, Ki-Ryong L, Kwang-Baik K, Ick-Tae Y. Water Res. 2007;41:2665-2671. DOI: 10.1016/j.watres.2007.02.028.
[9] Guangming Z, Jing Y, Huanzhi L, Jie Z. Bioresour Technol. 2009;100:1505-1509. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.08.041.
[10] Tak-Hyun K, Sang-Ryul L, Youn-Ku N, Jeongmok Y, Chulhwan P, Myunjoo L. Desalination. 2009;246:275-284. DOI: 10.1016/j.desal.2008.06.023.
[11] Barjenbruch M, Kopplow O. Adv Environ Res. 2003;7:715-720. DOI: 10.1016/S1093-0191(02)00032-1.
[12] Guang-Hui Y, Pin-Jing H, Li-Ming S, Yi-Shu Z. Water Res. 2008;42:1925-1934. DOI: 10.1016/j.watres.2007.11.022.
[13] Azize A, Ayse F, Diclehan S, Ersan K. J Environ Sci Health, Part A: Toxic/Hazard Substances and Environ Eng. 2008;43:1528-1535. DOI: 10.1080/10934520802293685.
[14] Stabnikova O, Liu XY, Wang JY. Elsevier Science. 2008;28:1654-1659. DOI: 10.1016/j.wasman.2007.05.021.
[15] Saktaywin W, Tsuno H, Nagare H, Soyama T, Weerapakkaroon J. Water Res. 2005;39:902-910. DOI: 10.1016/j.watres.2004.11.035.
[16] Montusiewicz A, Lebiocka M, Rożej A, Zacharska E, Pawłowski L. Bioresour Technol. 2010;101:3466-3473. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.125.
[17] Örmeci B, Vesilind AP. Water Res. 2001;35:4299-4306. DOI: 10.1016/S0043.
[18] Jean DS, Chu CP, Lee DJ. Water Res. 2000;34:1577-1583. DOI: 10.1016/S0043-1354(99)00303-6.
[19] Wang Q, Fujisaki K, Ohsumi Y, Ogawa IH. J of Environ Sci and Health, Part A: Toxic/Hazard Substances and Environ Eng. 2001;36:1361-1371. DOI: 10.1081/ESE-100104884.
[20] Jean DS, Chu CP, Lee DJ. Separation Sci and Technol. 2001;36:2733-2746. DOI: 10.1081/SS-100107222.
[21] Grűbel K, Chrobak E, Rusin A, Machnicka A. Eliminacja Clostridium perfringens podczas kondycjonowania osadu czynnego nadmiernego. Inż Ekol. 2013;32:40-47.
[22] Nowicka E, Machnicka A. Ocena skuteczności osadu nadmiernego suchym lodem. Współczesne problemy ochrony środowiska. Gliwice: Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska; 2013.
[23] Hu K, Jun-Qiu J, Qing-Liang Z, Duu-Jong L, Kun W, Wei Q. Water Res. 2011;45:5969-5976. DOI: 10.1016/j.watres.2011.08.064.
[24] Jeyasekaran G, Ganesan P, Anandaraj R, Jeya Shakila R, Sukumar D. Food Microbiol. 2006;23:526-533. DOI: 10.1016/j.fm.2005.09.009.
[25] Jean DS, Lee DJ, Chang CY. Adv in Envir Res. 2001;5:145-150. DOI: 10.1016/S1093-0191(00)00052-6.
[26] Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD, editors. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th edn.). Washington: American Public Health Association; 1999.
[27] Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. Metcalf & Eddy, Inc.; 2002.
[28] Kunz P, Wagner S. Results and outlooks of investigations of sewage sludge disintegration - Ergebnisse und Perspektive aus Untersuchungen zur Klärschlammdesintegration. Heft 1: AWT Abwassertechnik; 1994.
[29] Müller J. Mechanical disintegration of sewage sludge - Mechanischer Klärschlammaufschluß-, Schriftenereihe ”Berichte aus der Verfahrenstechnik” der Fakultät für Maschinenbau und Elektrotechnik der Universität Braunschweig. Aachen, Germany: Shaker Verlag; 1996.
[30] Müller J. Disintegration as key-step in sewage sludge treatment. Water Sci Technol. 2000;41:123-139.

IMPROVING OF ANAEROBIC DIGESTION BY DRY ICE DISINTEGRATION OF SURPLUS ACTIVATED SLUDGE

Department of Environmental Microbiology and Biotechnology
Institute of Environmental Protection and Engineering, University of Bielsko-Biala

Abstract: Disintegration by dry ice has a positive effect on the degree and rate of surplus activated sludge anaerobic digestion. By applying thermal disintegration the lysis of cells occurs in minutes instead of days. The intracellular and extracellular components are set free and are immediately available for biological degradation which leads to an improvement of the subsequent anaerobic process. Thermal disintegration by dry ice of the surplus activated sludge results in organic matter and a polymer transfer from the solid phase to the liquid. During disintegration process soluble chemical oxygen demand (SCOD) value and proteins concentration increase about 583 and 265 mg/dm^3, respectively. In the same time concentration of carbohydrates increase about 53 mg/dm^3. In addition the degree of thermal disintegration changed from 13% for the volume ratio of dry ice to surplus activated sludge 0.25:1 to 49% for the volume ratio of dry ice to sludge 1:1. The addition of thermal disintegrated sludge (30% SASDI of volume) to the digestion process leads to increased biogas production about 49%.

Keywords: dry ice, soluble chemical oxygen demand, proteins, carbohydrates, anaerobic digestion, biogas

[7A]

Nowicka E., Machnicka A. (2014) Higienizacja osadu nadmiernego suchym lodem. Proceedings of ECOpole. 7(2), 673 – 678. DOI: 10.2429/proc.2013.7(2)088.

DOI: 10.2429/proc.2013.7(2)088 2013;7(2)

Ewelina NOWICKA[1] i Alicja MACHNICKA[1]

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 laseczek *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 SiO_2/dm^3 oraz wzrost wartości $ChZT_{Cr}$ o 549 mg O_2/dm^3, 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 m^3/d. Obecnie ilość dopływających ścieków wynosi ok. 90 000 m^3/d, czas zatrzymania ścieków ok. 14 dni, a stężenie osadu czynnego w bioreaktorze ok. 4500 mg/dm^3.

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 cm^3. 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.

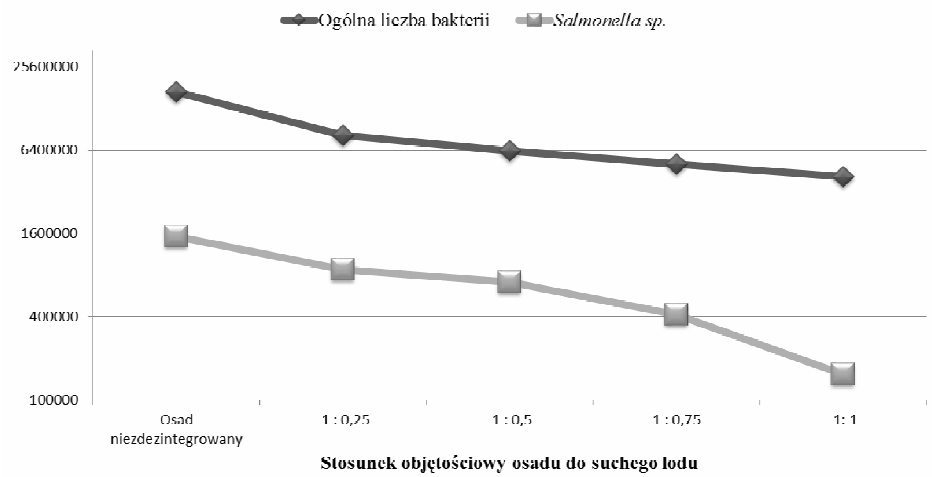
Przedstawiona graficznie liczebność bakterii w 1 g osadu nadmiernego przed i po procesie higienizacji suchym lodem była średnią arytmetyczną z trzech serii badawczych.

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).

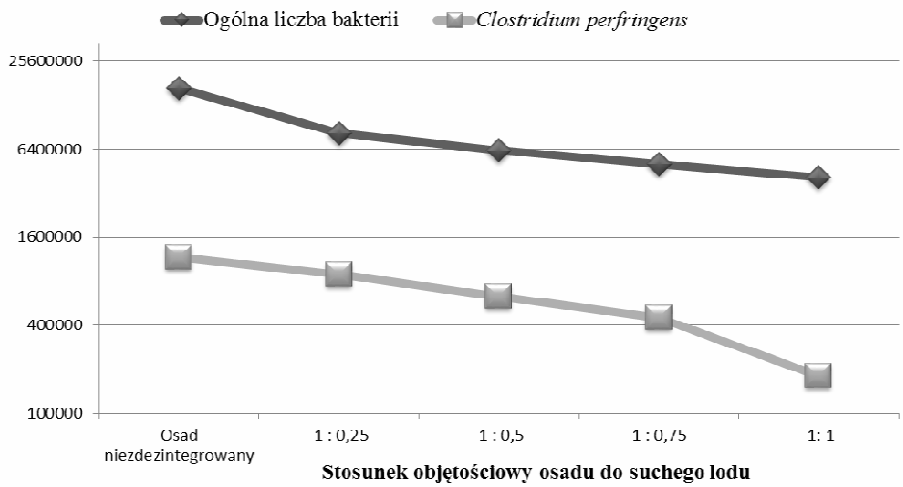
Suchy lód oddziaływał niszcząco na bakteryjny wskaźnik oceny sanitarnej osadów ściekowych. Liczebność pałeczek z rodzaju *Salmonella* w 1 g osadu nadmiernego niepoddanego higienizacji suchym lodem wynosiła 1 515 170 jtk/g s.m.o. (rys. 1), natomiast po procesie higienizacji dla stosunku objętościowego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

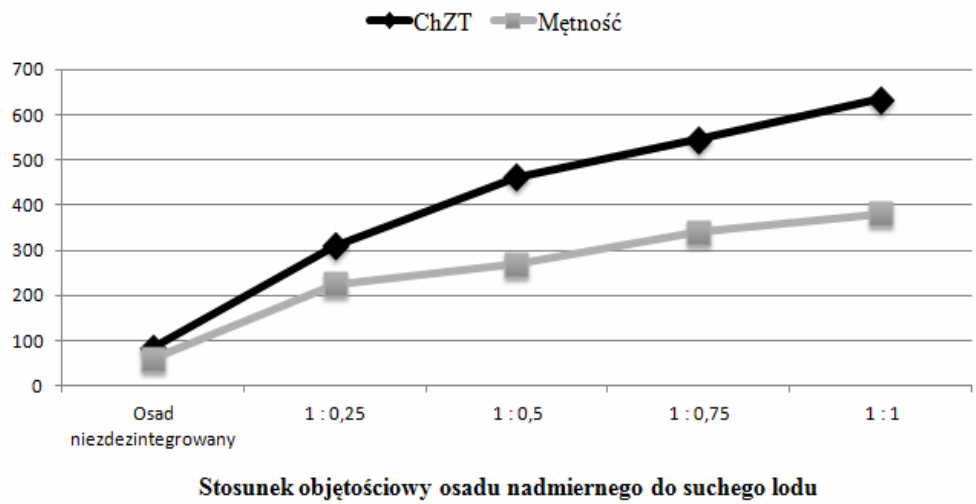
Uzyskane wyniki mikrobiologiczne pozwalają konkludować, że higienizacja suchym lodem może stać się nową, korzystną metodą udoskonalania procesów higienizacji osadów ściekowych.

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 O_2/dm^3 (rys. 3), natomiast po dezintegracji dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 wartość $ChZT_{Cr}$ wzrosła do 634 mg O_2/dm^3 (rys. 3).

Zniszczenie mikrobiologicznej struktury kłaczków 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 SiO_2/dm^3 (rys. 3), a po procesie destrukcji, dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, uległa zwiększeniu o 320 mg SiO_2/dm^3 (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 O_2/dm^3, natomiast mętność cieczy o 320 mg SiO_2/dm^3.

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 czynny. 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 SiO_2/dm^3 has been proven, as well as an increase in the value of COD_{Cr} by 549 mg O_2/dm^3, which indicates the release of organic matter into the liquid phase.

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

[8A]

Nowicka E., Machnicka A. (2013) Ocena skuteczności higienizacji osadu nadmiernego suchym lodem. Gliwice: Monografia. Współczesne problemy ochrony środowiska, 105 – 113.

Ocena skuteczności higienizacji osadu nadmiernego suchym lodem

Ewelina Nowicka, Alicja Machnicka

1. Wstęp

Wszystkim procesom oczyszczania ścieków towarzyszy powstawanie osadów, a ich ilość i jakość zależy od rodzaju i stężeń zanieczyszczeń zawartych w ściekach surowych [1].

Osady ściekowe ze względu na własności fizyczne, chemiczne oraz na obecność bakterii chorobotwórczych, są niezwykle heterogennym materiałem, niebezpiecznym z sanitarno – epidemiologicznego punktu widzenia. Dlatego mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka, a także dla środowiska, ponieważ są dobrym substratem do namnażania różnych grzybów strzępkowych, drożdżaków, grzybów drożdżopodobnych oraz mikroorganizmów patogennych [2]. W związku z tym obecność drobnoustrojów chorobotwórczych w osadach ściekowych jest jednym z decydujących czynników, jakie należy brać pod uwagę w przypadku dalszego postępowania z tego rodzaju odpadem.

Najnowsze przepisy wymuszają na wytwórcach (oczyszczalniach) zmianę tych niekorzystnych właściwości poprzez pozbawienie ich negatywnego oddziaływania na środowisko [3] z wykorzystaniem odpowiednich metod przeróbki i utylizacji osadów. Technologie te mogą przyczynić się do częściowej lub całkowitej eliminacji bakterii patogennych. Jedną z takich metod może być zastosowanie higienizacji osadów ściekowych z wykorzystaniem suchego lodu.

W wielu krajach europejskich, stosujących wymóg kontroli sanitarnej osadów ściekowych, rzadko uwzględnia się pojedynczy mikroorganizm wskaźnikowy. Przeważnie obowiązujące oraz projektowane kryteria sanitarne obejmują kilka drobnoustrojów wskaźnikowych, a do najczęściej stosowanych należą *Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Clostridium perfringens*, rodzina *Enterobacteriaceae*, a wśród nich *Salmonella* [4].

W Polsce do niedawna gatunkiem będącym wskaźnikiem sanitarnym osadów ściekowych wśród bakterii była pałeczka laktozododatnia *Escherichia coli*. Obecnie na podstawie Rozporządzenia Ministra Środowiska [5] w ocenie sanitarnej wykorzystuje się nowy wskaźnik bakteryjny *Salmonella* sp. *Salmonella* sp. to pałeczka względnie beztlenowa, powszechnie bytująca w ściekach, osadach ściekowych i zanieczyszczonej wodzie [6]. Jest najbardziej rozpowszechnionym patogenem wywołującym gastroenteritis, dury brzuszne, dury rzekome oraz schorzenia określane jako Salmonelloza [7 - 10]. Efekt toksyczny spowodowany jest zapaleniem błon śluzowych na skutek uwolnienia lipopolisacharydu [6]. W oparciu o Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 13 lipca 2010 [5], osady ściekowe pochodzenia komunalnego zostają dopuszczone do użytku wtedy, gdy w 100 gramach badanego osadu nie stwierdzono obecności bakterii z rodzaju *Salmonella*.

Escherichia coli, podobnie jak rodzaj *Salmonella*, należy do rodziny *Enterobacteriaceae* [11 - 13]. Pałeczka ta jest gramujemną bakterią, nie wytwarzającą przetrwalników, zdolną do wzrostu w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Występuje w ściekach surowych, ściekach oczyszczonych, osadach ściekowych oraz w wodach powierzchniowych, gdzie określana jest wskaźnikiem zanieczyszczenia fekalnego. Znajduje się również w dużych ilościach w odchodach ludzkich i zwierzęcych, gdzie może osiągać stężenia do 10^9 jtk^2 w 1 gramie świeżych odchodów [14 - 17].

W ostatnich latach w Europie proponowano wiele metod, które przez wykorzystanie różnych bakterii (*Escherichia coli*, *Bifidobacterium* sp., *Clostridium perfringens*, *Rhodococcus coprophilus*, paciorkowce kałowe) oraz wirusów (bydlęce enterowirusy), umożliwiłyby identyfikowanie i rozróżnianie źródeł mikrobiologicznego zanieczyszczenia wód powierzchniowych, a także osadów ściekowych [18]. Stwierdzono, że do takich celów mogą posłużyć wirusy bakteryjne (bakteriofagi), które już wcześniej były brane pod uwagę jako pośredni wskaźnik obecności enterowirusów w osadach oraz jako pośredni wskaźnik zanieczyszczenia fekalnego [10, 19 - 21].

Bakteriofagi są to wirusy wewnątrzkomórkowe, które namnażają się wewnątrz bakterii poprzez biosyntezę gospodarza. Badaniom dotyczącym wód, ścieków i osadów ściekowych najczęściej poddawane są trzy grupy: somatyczne colifagi, które zakażają szczepy *Escherichia coli* poprzez receptory ściany komórkowej, F – specyficzne bakteriofagi RNA, które zakażają szczepy *Escherichia coli* poprzez fimbrie płciowe, a także bakteriofagi beztlenowców [22, 23]. Z tej grupy jako najlepsze do identyfikowania fekalnego zanieczyszczenia środowiska wodnego oraz jego pochodzenia wskazywane są somatyczne colifagi [24]. Opisano wiele różnych metod ich wykrywania, z których do najpowszechniejszych należy metoda, polegająca na izolowaniu ich w postaci łysinek na specyficznym podłożu oraz wykazywaniu ich obecności metodami biologii molekularnej [25 - 29]. Love i Sobsey [30] uważają, że bakteriofagi są lepszymi wskaźnikami jakości wody niż bakterie z grupy *coli* czy miano określane NPL.

Celem przeprowadzonych badań było dokonanie oceny skuteczności procesu higienizacji osadu nadmiernego suchym lodem. Potwierdzeniem destrukcyjnego działania suchego lodu na mikroorganizmy i kłaczki osadu było uwolnienie materii organicznej ($ChZT_{Cr}$) oraz wzrost mętności cieczy nadosadowej.

Stały dwutlenek węgla, czyli suchy lód, to produkt powstający w wyniku rozprężania ciekłego dwutlenku węgla. Suchy lód zmienia stan skupienia w temperaturze powyżej minus 78,5 °C, a podczas ogrzewania nie topi się lecz sublimuje bezpośrednio do postaci gazowej CO_2 [31, 32]. Jest bezwodny, niepalny, nietoksyczny oraz nie posiada smaku ani zapachu. Jest wykorzystywany w cateringu, w chłodnictwie, w czyszczeniu wszelkiego typu maszyn oraz w laboratoriach do spowolnienia reakcji egzotermicznych [33], a obecnie także do przeróbki osadów ściekowych.

2. Materiał i metoda

Materiałem do badań był osad czynny nadmierny, pochodzący z oczyszczalni ścieków zlokalizowanej na terenie województwa śląskiego. Oczyszczalnia ta stosuje zaawansowane procesy biologicznego oczyszczania ścieków, polegające na równoczesnym usuwaniu związków organicznych oraz biogenów azotu i fosforu. Natężenie dopływu ścieków w tej oczyszczalni wynosi 90 000 m^3/d, czas zatrzymania ścieków ok. 14 dni, a stężenie suchej masy w bioreaktorze jest na poziomie 4 320 – 4 640 mg/l.

Higienizację/dezintegrację osadu nadmiernego prowadzono z wykorzystaniem suchego lodu o następujących stosunkach objętościowych osadu do suchego lodu, tj.: 1 : 0,25; 1 : 0,5; 1 : 0,75; 1 : 1.

Ocenę wpływu suchego lodu jako metody higienizacji osadu nadmiernego oparto o analizę zmian liczebności: *Escherichia coli*, somatycznych colifagów oraz *Salmonella* sp. Oznaczenia drobnoustrojów przeprowadzono według procedury 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

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

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

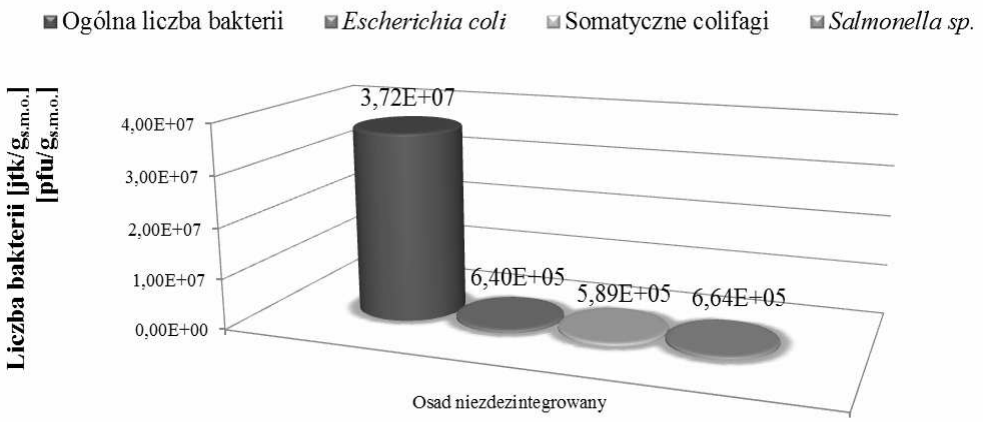
W próbkach osadu nadmiernego przed i po procesie dezintegracji suchym lodem oznaczono parametr wskazujący na uwolnienie materii organicznej ($ChZT_{Cr}$) oraz mętność fazy płynnej osadu. Oznaczenia chemiczne wykonano w oparciu o metodykę zawartą w Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 19th Edition [35], wykorzystując Spektrofotmetr firmy DR LANGE Xion 500.

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

3. Wyniki i dyskusja

Celem badań mikrobiologicznych było wykazanie możliwości zastosowania suchego lodu do higienizacji osady czynnego nadmiernego.

Przeprowadzone analizy mikrobiologiczne ujawniły skażenie osadu nadmiernego patogenami (rys. 3.1.).

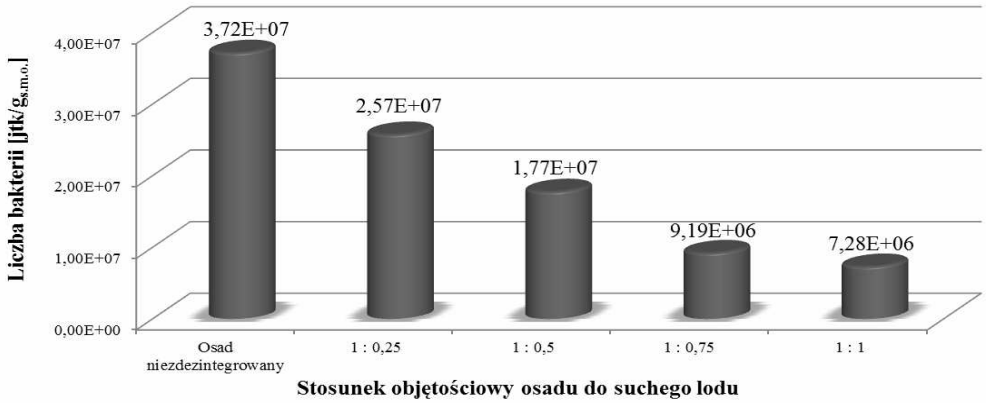


Rys. 3.1. Liczba bakterii w osadzie nadmiernym przed procesem higienizacji.

W 1 gramie suchej masy osadu stwierdzono ogólną liczbę bakterii wynoszącą 37 152 848 jtk (rys. 3.1.). W tej liczbie oznaczono: 639 962 jtk/$g_{s.m.o.}$ pałeczek *Escherichia coli*, 589 312 pfu/$g_{s.m.o.}$ somatycznych colifagów oraz 663 828 jtk/$g_{s.m.o.}$ pałeczek *Salmonella* sp. (rys. 3.1.).

Poddanie osadu nadmiernego higienizacji termicznej z wykorzystaniem suchego lodu spowodowało zmniejszenie ogólnej liczby bakterii *Escherichia coli*, somatycznych colifagów, a także *Salmonella* sp., o czym świadczą uzyskane wyniki analiz mikrobiologicznych (rys. 3.2. – 3.5.).

Zastosowany suchy lód spowodował destrukcję mikroorganizmów, a tym samym przyczynił się do częściowej higienizacji osadu nadmiernego (rys. 3.2.).

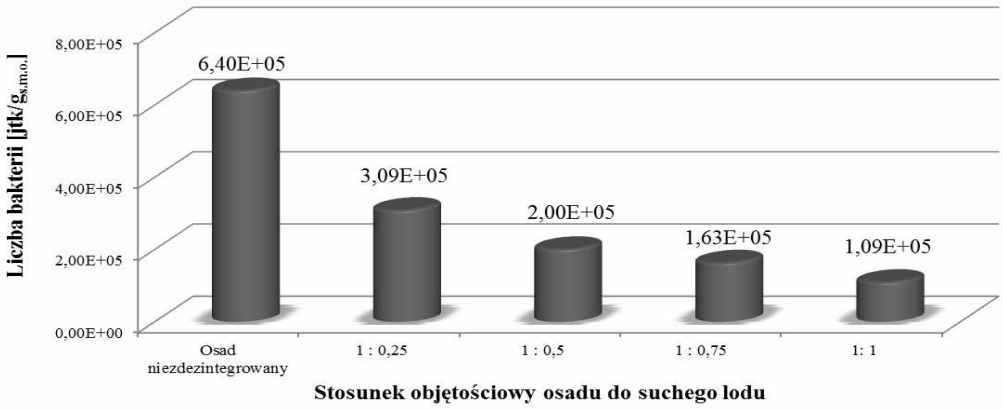


Rys. 3.2. Ogólna liczba bakterii (jtk) w 1 g osadu nadmiernego przed i po procesie higienizacji suchym lodem.

W osadzie nadmiernym niepoddanym zamrożeniu/rozmrożeniu, ogólna liczba bakterii wynosiła 37 152 848 jtk/$g_{s.m.o.}$ (rys. 3.2.). Po procesie higienizacji suchym lodem, ogólna liczba bakterii uległa redukcji (rys. 3.2.):

- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25, o 31 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,5, o 52 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,75, o 75 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, o 80 %.

Higienizacja termiczna osadu za pomocą suchego lodu doprowadziła do spadku liczebności *Escherichia coli* wraz ze wzrostem stosunku objętościowego suchego lodu do osadu (rys. 3.3.).

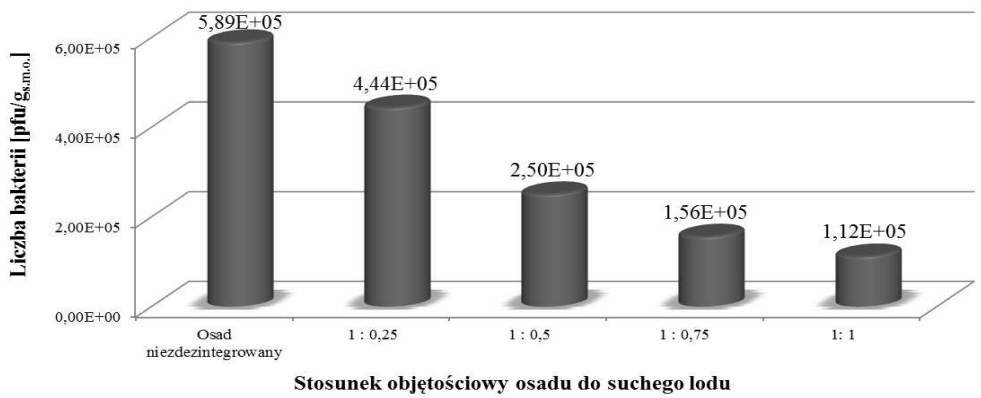


Rys. 3.3. Wpływ higienizacji osadu suchym lodem na liczebność pałeczek *Escherichia coli*.

Liczebność pałeczek *Escherichia coli* w osadzie niepoddanym higienizacji suchym lodem wynosiła 639 962 jtk/$g_{s.m.o}$ (rys. 3.3.), natomiast po procesie higienizacji, liczba ta uległa redukcji (rys. 3.3.):

- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25, o 52 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,5, o 69 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,75, o 74 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, o 83 %.

Poddanie osadu nadmiernego działaniu higienizacji przez zamrażanie spowodowało również zmniejszenie liczby somatycznych colifagów (rys.3. 4.).



Rys. 3.4. Wpływ higienizacji osadu suchym lodem na liczebność somatycznych colifagów.

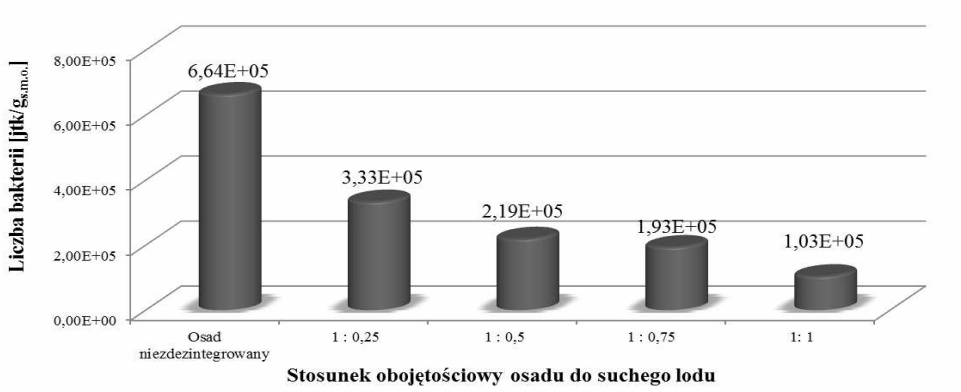
W 1 gramie suchej masy osadu niepoddanego higienizacji suchym lodem liczba colifagów wynosiła 589 312 pfu (rys. 3.4.). Proces termicznej higienizacji spowodował redukcję bakteriofagów (rys. 3.4.):

- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25, o 25 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,5, o 58 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,75, o 74 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, o 81 %.

Suchy lód oddziaływał niszcząco na bakteryjny wskaźnik oceny sanitarnej osadów ściekowych (rys. 3.5.).

Liczebność pałeczek z rodzaju *Salmonella* w 1 g osadu nadmiernego niepoddanego higienizacji suchym lodem wynosiła 663 828 jtk (rys.3. 5.), natomiast po procesie termicznym, liczba ta zmniejszyła się (rys. 3.5.):

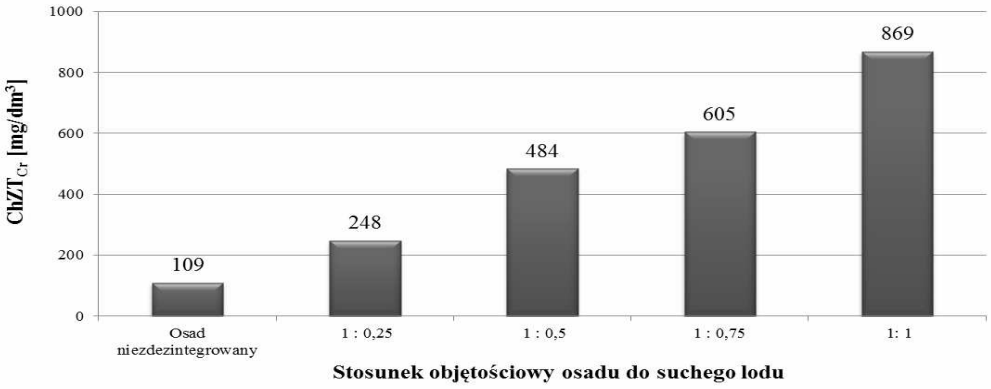
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25, o 50 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,5, o 67 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,75, o 71 %,
- dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, o 84 %.



Rys. 3.5. Wpływ higienizacji osadu suchym lodem na liczebność pałeczek *Salmonella sp.*

Proces zamrażania/rozmrażania jest skuteczną techniką w odwadnianiu osadów ściekowych, ale także w intensyfikacji wewnątrzkomórkowych związków organicznych do fazy płynnej osadu na co zwrócili uwagę Randall i Hong [36, 37].

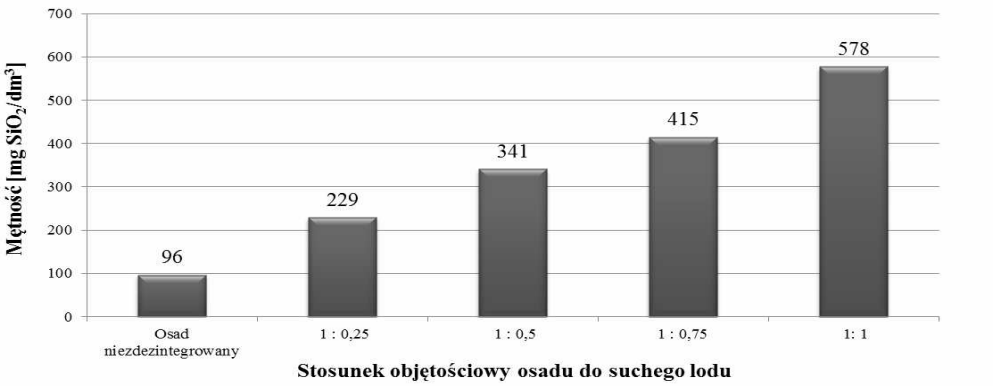
Dezintegracja osadu nadmiernego suchym lodem powodowała uwolnienie materii organicznej (wyrażonej jako $ChZT_{Cr}$) w cieczy nadosadowej. Zmiany $ChZT_{Cr}$ związane były z rozerwaniem kłaczków osadu nadmiernego oraz komórek mikroorganizmów, co prowadziło do uwolnienia wewnątrzkomórkowych związków organicznych do fazy płynnej osadu (rys. 3.6.).



Rys. 3.6. Uwolnienie materii organicznej (wyrażonej wartością $ChZT_{Cr}$) przed i po dezintegracji suchym lodem.

Dezintegracja suchym lodem dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 0,25 przyczyniła się do wzrostu $ChZT_{Cr}$ z wartości początkowej 109 mg O_2/dm^3 do 248 mg O_2/dm^3 (rys. 3.6.). Zwiększając dawkę suchego lodu do osadu w proporcji 1 : 1, $ChZT_{Cr}$ osiągnęło wartość 869 mg O_2/dm^3 (rys. 3.6.).

Zniszczenie mikrobiologicznej struktury kłaczków suchym lodem przyczyniło się do wzrostu mętności fazy płynnej osadu, głównie na skutek uwolnienia substancji wewnątrzkomórkowej i zewnątrzkomórkowych polimerów (rys. 3.7.).



Rys. 3.7. Wzrost mętności cieczy nadosadowej przed i po procesie dezintegracji suchym lodem.

W osadzie nadmiernym niepoddanym dezintegracji suchym lodem, mętność cieczy nadosadowej wynosiła 96 mg SiO_2/dm^3 (rys. 3.7.), a po procesie destrukcji dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, mętność uległa zwiększeniu o 482 mg SiO_2/dm^3 (rys. 3.7.).

4. Wnioski

Analizy mikrobiologiczne wykazały higienizujące działanie suchego lodu na osad czynny nadmierny. Ogólna liczba bakterii w 1 g osadu dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1 uległa redukcji o 80%, liczebność pałeczek *Salmonella* sp. obniżyła się o 84%, *Escherichia coli* o 83%, natomiast liczba somatycznych colifagów o 81%.

Suchy lód wpłynął destrukcyjnie na osad czynny nadmierny powodując uwolnienie materii organicznej wyrażonej wartością $ChZT_{Cr}$ oraz wzrost mętności fazy płynnej osadu. Dla stosunku objętościowego osadu do suchego lodu 1 : 1, stwierdzono 8 krotny wzrost wartości $ChZT_{Cr}$ oraz 6 krotny wzrost mętności cieczy nadosadowej.

Literatura

1. Fukas - Płonka Ł., Zielewicz - Madej E. Zasady wyboru technologii przeróbki osadów ściekowych. Mat. Sem. Narady Proj. BPBK Katowice. Ustroń. 1995. 43 - 51.
2. Kaźmierczuk M., Kalisz L. Bakterie hemolizujące proponowanym wskaźnikiem skuteczności i higienizacji wapnem komunalnych osadów ściekowych. Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych. Warszawa. 2010;42:183 - 191.
3. Zielewicz - Madej E., Fukas - Płonka Ł. Nowe techniki badań osadów ściekowych i kontroli procesów przeróbki osadów. Mat. Sem. Szk. Przeróbka i zagospodarowanie osadów dla małych i średnich oczyszczalni ścieków. Gdańska Fundacja Wody. Gdańsk. 1998.
4. Lepeuple S., Gaval G., Jovic M., De Roubin M. R. Literature review on levels of pathogens and abatements of them in the field of sludge, soil and treated biowastes. Hygienic parameters. Horizontal 6 WP - 3. 2004.
5. Rozporządzenia Ministra Środowiska (Dz. U. z 2010 Nr. 137, poz. 924).
6. Schlegel G. H. Mikrobiologia ogólna. Warszawa. 2005.

7. Bień J. Osady ściekowe. Teoria i praktyka. Częstochowa: Wyd. Polit. Częstoch. 2007.
8. Virella G. Microbiology and infectious diseases. Baltimor: Wyd. Williams & Willins a Waverly Company; 2000.
9. Chan S. S. W., Ng K. C., Lyon D. J, Cheung W. L., Cheng A. F. B., Rainer T. H. Acute bacterial gastroenteritis: a study of adult patients with positive stool cultures treated in the emergency department. Emerg. Med. J. 2003;20:335 – 338.
10. Lunn A. D., Fàbrega A., Sánchez - Céspedes J., Vila J. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among *Salmonella spp*. clinical isolates. Research Support, Non-U.S. Gov't. 2010;13:15 - 20.
11. Łoniewska - Grabińska A., Siński E. Mikroorganizmy chorobotwórcze i potencjalnie chorobotwórcze w ekosystemach wodnych i sieciach wodociągowych. Seidel-Przywecki. Warszawa. 2010.
12. Wytyczne WHO dotyczące jakości wody do picia. Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych. Warszawa. 1998.
13. Elena F. S., Whittman S. T., Winkworth L. C., Riley A. M., Lenski E. R. Genomic divergence of *Escherichia coli* strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates. Interantional Microbiology. 2005;8:271 – 278.
14. Sobieszczańska M. B. Hemolizyny *Escherichia coli*. Post. Mikrobiologiczne. 2007;46:343 - 353.
15. Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2010;8:207 - 217.
16. Leopold S. R., Sawyer S. A., Whittam T. S., Tarr P. I. Obscured phylogeny and possible recombinational dormancy in *Escherichia coli*. Evolutionary Biology. 2011;11:183 - 192.
17. Martin V. J. J., Pitera D. J., Withers S. T., Newman J. D., Keasling J. D. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. Nature Biotechnology. 2003;21:796 - 802.
18. Kirs M., Smith D. C. Multiplex quantitative real-time reverse-transcriptase PCR for F+ – specific RNA coliphages: a method for use in microbial source tracking. Appl. Env. Microbiol. 2007;73:808 – 814.
19. Anon. Bacteriophages as model viruses in water quality. IAWPRC Study Group Report. Wat. Res. 1991;25:529 - 54.
20. Armon R., Kott Y. Bacteriophages as indi- cators of pollution. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 1995;26:299 - 335.
21. Marbbn Ch. The Isolation and typing of *Coliphages* specific to various wild-type *Escherichia coli* strains and phage - resistant mutants. The Journal of undergraduate Biological Studies. 2008;1:1-3.
22. Stanek E. J. Development of a rapid *Coliphage* detection assay. Master of Science in Microbiology. Virgina. 1997.
23. Śliwa - Dominiak J., Tokarz - Deptuła B., Deptuła W. F - specyficzne Bakteriofagi z grupy *coli* w próbkach wody pochodzących ze śródmiejskiego jeziora w Szczecinie. Woda – Środowisko – Obszary wiejskie. 2010;10:189 - 199.

24. Green J., Bruce K., Mutesi R. The Apha standard metod for the enumeration of somatic *Coliphages* in water has low efficiency of plating. Wat. Res. 2000;34:759 – 762.
25. Brezina S. S., Baldini D. M. Detection of somatic coliphages as indicators of faecal contamination in estuarine waters. Revista Argentina de Microbiología. 2008;40: 72 - 74.
26. Ibarluzea J. M., Moreno B., Serrano E., Larburu K., Maiztegi M. J., Yarzabal A., Santa Marina L. Somatic coliphages and bacterial indicators of bathing water quality in the beaches of Gipuzkoa, Spain. Journal of Water and Health. 2007;3:417 – 426.
27. Grabow W., Vrey A., Uys M., De Villiers J. C. Evaluation of the application of Bacteriophages as indicators of water quality. WRC Report No. Water Research Commission, Pretoria. 1998;540/1/98.
28. SO (1998a) Water quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages. Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages. ISO/DIS 10705-2.2. International Organization for Standardization, Geneva. 17 pp.
29. Standard methods (1998) Coliphage detection. In: Clesceri LS, Greenberg AE and Eaton AD (eds.) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th edn.) American Public Health Association, Washington DC. 9-24 - 9-25.
30. Love D.C., Sobsey D.C. Simple and rapid F+ coliphage culture, latex agglutination and typing assay to detect and source track fecal contamination. Appl. Env. Microbiol. 2007;73:4110 – 4118.
31. Kozłowski Z, Gutowski R. Chemia nieorganiczna dla techników chemicznych. Warszawa: Wyd Szkol i Pedag; 1996.
32. Cotton A, Wilkinson G, Gaus PL. Chemia nieorganiczna. Warszawa. 1995.
33. Jean DS, Lee DJ, Chang CY. Adv in Envir Res. 2001;5:145–150. DOI: 10.1016/S1093-0191(00)00052-6.
34. 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.
35. 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.
36. Randall C. W., Ali Khan M. Z. and Stephens N. T. Waste activated sludge conditioning by direct slurry freezing. Water Res. 1975;9:917.
37. Hong S. G., Young J. D., Chen G. W., Chang I. L., Hung W. T. and Lee D. J. Freeze/thaw treatment on waste activated sludge: a FTIR spectroscopic study. J. Environ. Sci. Health A. 199530(8), 1717