

Maria WŁODARCZYK-MAKUŁA

Politechnika Częstochowska, Katedra Chemii, Technologii Wody i Ścieków
ul. Dąbrowskiego 69, 42-200 Częstochowa

Ilościowe zmiany WWA w osadach i cieczach nadosadowych podczas fermentacji prowadzonej w warunkach denitryfikacji

Przedstawiono wyniki badań zmian ilościowych WWA w osadach ściekowych i cieczach nadosadowych podczas fermentacji osadów w warunkach redukcji azotanów. W badaniach wykorzystano osady surowe i przefermentowane z miejskiej oczyszczalni ścieków, do której wprowadza się do oczyszczania ścieki bytowe oraz przemysłowe. Osady wymieszano i inkubowano w ciemności w temperaturze 36°C. W celu zapewnienia warunków denitryfikacji do osadów wprowadzono NaNO₃. Równoległe, w takich samych warunkach jak fermentacja, prowadzono badania z osadami, w których zahamowano aktywność mikroorganizmów. Analizowano WWA przed inkubacją, po 8 dobach oraz po 22 dobach. Ilościowo określono stężenia 2-, 3- oraz 4-pierścieniowych WWA (rekomendowanych przez EPA) z wykorzystaniem zestawu chromatograf gazowy - spektrometr masowy. Oznaczenia WWA prowadzono równoległe w osadach (w fazie stałej) oraz w cieczach nadosadowych. Po 22 dobach fermentacji zanotowano zmiany ilościowe WWA w osadach i w cieczach. Podczas hydrolizy złożonych związków organicznych (wstępna faza procesu) w osadach kontrolnych odnotowano wzrost stężenia sumarycznego (szczególnie naftalenu i 3-pierścieniowych WWA). Efektywność usuwania poszczególnych związków była zróżnicowana. Po 22 dobach inkubacji stężenie 10 WWA w osadach obniżyło się o 22% w warunkach denitryfikacji, natomiast zawartość badanych WWA w osadach kontrolnych była większa od początkowej. W cieczach nadosadowych stężenie WWA było mniejsze o 31% w warunkach redukujących azotany. Udział procesów abiotycznych w usuwaniu WWA w cieczach był znaczący. W cieczach wydzielonych z osadów, w których zahamowano aktywność mikroorganizmów, spadek stężenia sumarycznego WWA wyniósł 47% w porównaniu ze stężeniem początkowym.

Słowa kluczowe: WWA, osady ściekowe, GC-MS, warunki denitryfikacji

Wstęp

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), chociaż zaliczane są do ksenobiotyków, to w pewnych warunkach mogą ulegać degradacji. Węglowodory o mniejszej ilości pierścieni łatwiej ulegają przemianom niż związki wielocząsteczkowe. Na szybkość rozkładu WWA ma wpływ, między innymi, obecność tlenu. Ocenia się jednak, że w warunkach beztlenowych szybkość rozkładu tych związków może być nawet 100-krotnie mniejsza niż w warunkach tlenowych [1-3]. WWA podczas oczyszczania ścieków kumulują się w osadach ściekowych, gdyż wykazują powinowactwo do cząstek stałych [4]. Obecność WWA potwierdzono w osadach ściekowych zarówno surowych, jak i ustabilizowanych [5-7]. Po fermentacji zwykle obserwowano zwiększone stężenia WWA w osa-

dach, zwłaszcza węglowodorów małowcząstkowych [8, 9]. Wcześniejsze badania wykazały, że podczas fermentacji, a szczególnie w fazie hydrolizy substratu organicznego, może nastąpić uwalnianie tych WWA do cieczy nadosadowych [10]. Badania przemian WWA w osadach poddawanych fermentacji w różnych warunkach utleniająco-redukujących opisane w literaturze nie są kompletne i wyniki często nie są jednoznaczne [11, 12]. Ponieważ w warunkach fermentacji metanowej bierze udział mieszana populacja mikroorganizmów, zbadanie udziału poszczególnych grup bakterii w procesie rozkładu WWA może przyczynić się do określenia odpowiednich parametrów procesu, zapewniających skuteczne usuwanie tych zanieczyszczeń. Udział poszczególnych populacji bakterii można uzyskać poprzez zapewnienie im określonych warunków rozwoju. W literaturze brakuje badań, w których analizowano równocześnie zmiany WWA w cieczach i w fazie stałej, w warunkach redukujących azotany oraz przy zahamowanej aktywności mikroorganizmów. Należy podkreślić, że stężenia w osadach podaje się w odniesieniu do suchej masy, pomijając zawartość tych związków w cieczach nadosadowych. Celem badań było porównanie zmian ilościowych WWA w osadach i cieczach podczas procesu fermentacji metanowej w obecności azotanów oraz podczas przechowywania osadów w warunkach odpowiadających fermentacji przy zahamowaniu aktywności mikroorganizmów.

1. Materiały i metody badań

1.1. Badane substraty

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem osadów z miejskiej oczyszczalni ścieków. Przeróbka osadów jest realizowana w procesie dwustopniowej fermentacji w zamkniętej i otwartej komorze fermentacji. Do badań pobrano dwie porcje osadów: surowy i przefermentowany. Osady surowe pochodziły z części mechanicznej oczyszczalni i zostały pobrane z zagęszczacza osadnika wstępnego. Osady przefermentowane pochodziły z odpływu zamkniętej komory fermentacji. Te drugie osady stanowiły materiał zaszczipiający osady mikroflorą fermentacyjną. Próbkę osadów pobrano losowo z miejskiej oczyszczalni ścieków jako jednorazowe. Osady wymieszano w proporcji objętościowej 1:10 odpowiednio osad surowy: osad przefermentowany. Wymieszane osady wstępnie scharakteryzowano, wykonując oznaczenia wilgotności oraz zawartości związków organicznych w fazie stałej, a także pomiaru pH i oznaczeniu zasadowości i lotnych kwasów tłuszczowych cieczy nadosadowej. Zmierzono także potencjał utleniająco-redukcyjny oraz zawartość azotu azotanowego zgodnie z metodyką podawaną przez Hermanowicza i innych [13]. Wilgotność zmieszanych osadów wynosiła 97%, a pH - 7,8. Zawartość związków organicznych w osadach była na poziomie 60% suchej masy. Zawartość lotnych kwasów tłuszczowych wynosiła 5,0 mval/l, a zasadowość była na poziomie 32÷34 mval/l. Stężenie azotu azotanowego było na poziomie 2 mg/l, natomiast po wprowadzeniu azotanów wzrosło do 6 g/l. Potencjał redox osadów zmieszanych wynosił -38 mV.

Ze zmieszanych osadów przygotowano następujące próbki:

- osady z dodatkiem azotanu sodu (NaNO_3) w ilości 6 g/l w celu intensyfikacji rozwoju bakterii denitryfikacyjnych prowadzących proces redukcji azotanów,
- osady z dodatkiem azydku sodu (NaN_3) w ilości 0,7 g/l w celu dezaktywacji mikroorganizmów [11, 14]
- osady kontrolne.

1.2. Przebieg badań

Badania fermentacji prowadzono w warunkach laboratoryjnych. Do prowadzenia fermentacji przygotowano sześć bioreaktorów o pojemności 5 litrów, do których wprowadzono ww. mieszaniny (w dwóch powtórzeniach). Bioreaktory przechowywano w termostacie w stałej temperaturze wynoszącej 36°C przez 22 dni. Codziennie wykonywano pomiar ciśnienia biogazu. Uwzględniając ciśnienie atmosferyczne, wyliczono objętość powstającego biogazu według prawa Boyle'a-Mariotta. Osady przeanalizowano, wykonując oznaczenia fizyczno-chemiczne: przed inkubacją i po 22 dobach fermentacji [13]. Analizę ilościową WWA prowadzono równoległe w osadach i cieczach nadosadowych trzykrotnie: przed fermentacją, po 8 dobach inkubacji oraz po 22 dobach fermentacji.

1.3. Metodyka oznaczania mikrozanieczyszczeń

Oznaczenia WWA wykonywano z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym. Przygotowanie próbek polegało na ekstrakcji z użyciem mieszaniny rozpuszczalników: cykloheksanu (polarność - 0,0) i dichlorometanu (polarność - 3,7) w proporcji objętościowej odpowiednio 5:1. Ekstrakcję prowadzono podczas sonifikacji w płucze ultradźwiękowej. Oddzielenie rozpuszczalników odbywało się poprzez odwirowanie w wirówce laboratoryjnej. Ekstrakty oczyszczano na żelu krzemionkowym w warunkach próżniowych. Oczyszczone ekstrakty zatężano w strumieniu azotu do objętości 1 ml i następnie analizowano chromatograficznie. Analizę jakościowo-ilościową przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego Fisons z kolumną kapilarną DB-5 o długości 25 m, grubości filmu 25 μm . Ilościowo oznaczano 2-, 3- i 4-pierścieniowe węglowodory, które są na liście EPA. Były to: naftalen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzo(a)antracen i chryzen. Spośród wymienionych węglowodorów w odniesieniu do dwóch ostatnich węglowodorów potwierdzono, że mają właściwości rakotwórcze [14].

Dla sprawdzenia procedury oznaczania WWA przyjętej w badaniach określono odzyski standardowej mieszaniny WWA z osadów. W tym celu do próbek wymieszanych osadów wprowadzono mieszaninę standardową WWA *Accu Standard Inc. USA* i przeprowadzono oznaczenie jakościowo-ilościowe WWA zgodnie z procedurą opisaną wyżej. Odzyski standardowej mieszaniny WWA

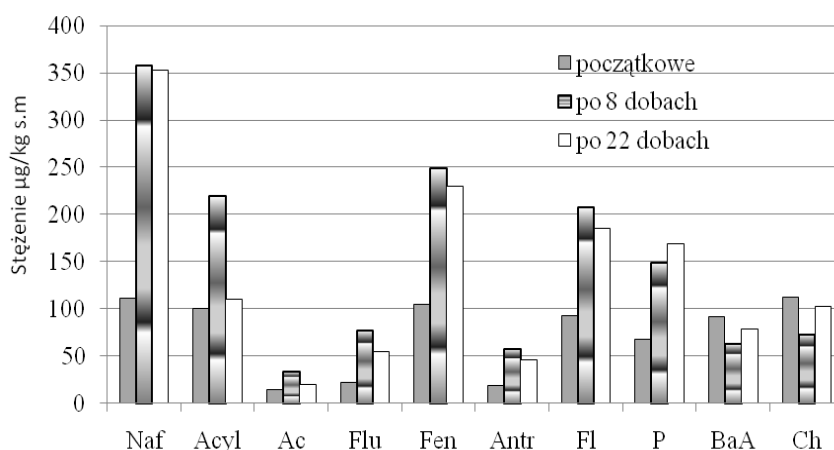
(z uwzględnieniem początkowej zawartości w badanych materiałach) wahały się w granicach od 29% (naftalen) do 94% (piren). Wartość średnia (z uwzględnieniem najbardziej lotnego naftalenu) wynosiła 65% i mieściła się w zakresie opisywanym w literaturze [7, 15].

2. Wyniki badań i dyskusja

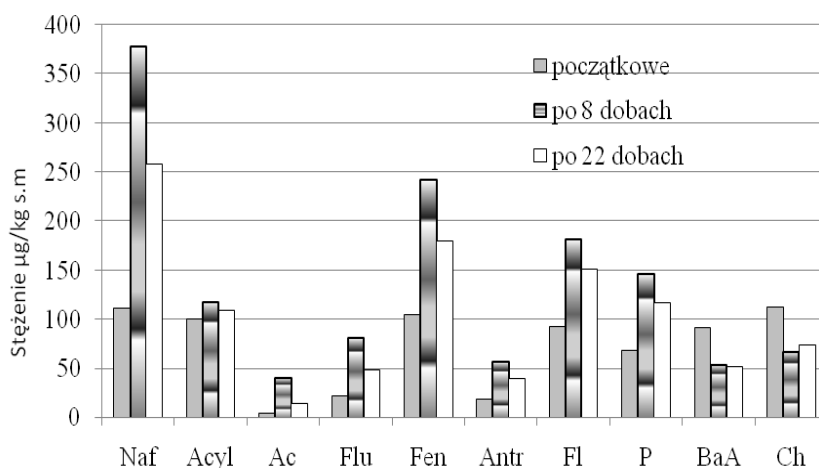
Po 22 dobach trwania fermentacji wartość pH wynosiła 8,2. Stężenie LKT spadło do wartości 2,6 mval/l, uwodnienie wzrosło do 98,5%. Substancje organiczne stanowiły 42% suchej masy. Wartość potencjału utleniająco-redukcyjnego była w zakresie od -380 do -350 mV. Objętość biogazu wynosiła $0,38 \pm 0,4$ l. Zanotowano spadek stężenia azotanów do wartości 4 g/l oraz wzrost zasadowości do wartości 7 val/l, co świadczy o przebiegu procesu denitryfikacji.

Zawartość początkowa 10 WWA w osadach wynosiła średnio $726 \mu\text{g/kg s.m.}$ Stężenie naftalenu wynosiło $111 \mu\text{g/kg s.m.}$ Węglowodory 3-pierścieniowe stanowiły 35% sumarycznej ilości badanych WWA. Stężenie 4-pierścieniowych było na poziomie $365 \mu\text{g/kg s.m.}$ Na rysunku 1 przedstawiono zmiany stężeń analizowanych węglowodorów w osadach przed fermentacją, po 8 dobach jej trwania oraz po zakończeniu eksperymentu (po 22 dobach). Stężenie w osadach kontrolnych we wstępnej fazie fermentacji, czyli podczas hydrolizy złożonych związków organicznych, wzrosło dwukrotnie. Po 8 dobach zaobserwowano, że zawartość badanych węglowodorów przekroczyła $1400 \mu\text{g/kg s.m.}$ Większe stężenia WWA we wstępnej fazie fermentacji obserwowano już we wcześniejszych badaniach [10]. W opisywanym doświadczeniu odnotowano znaczący wzrost stężenia naftalenu oraz 3-pierścieniowych związków. Stężenie naftalenu po 8 dobach fermentacji wynosiło $358 \mu\text{g/kg s.m.}$ i utrzymało się na tym poziomie do 22 doby inkubacji. W końcowym etapie badań stężenie sumaryczne WWA wynosiło $1349 \mu\text{g/kg s.m.}$ W tym przypadku odnotowano mniejsze stężenia acenaftyleny, acenaftenu i fluoreny, podczas gdy pozostałych węglowodorów były na poziomie podobnym jak po 8 dobach inkubacji.

Przebieg zmian stężeń WWA w osadach poddawanych fermentacji w warunkach denitryfikacji był podobny do zmian stężenia analizowanych związków w osadach kontrolnych. Dodatek azotanów nie hamował uwalniania się WWA i w fazie hydrolizy również obserwowano większe stężenia WWA. Na rysunku 2 przedstawiono zmiany stężenia poszczególnych związków podczas inkubacji. W końcowej fazie fermentacji odnotowano ubytek większości badanych węglowodorów. Sumaryczne stężenie końcowe było o 24% mniejsze od zanotowanego po 8 dobach. Końcowe stężenie ośmiu węglowodorów było na poziomie $1043 \mu\text{g/kg s.m.}$ Możliwe jest zatem, że bakterie denitryfikacyjne, których rozwój wspomagano dodatkową ilością azotanów, mogą powodować rozkład WWA. Dotyczy to badanych węglowodorów z wyłączeniem acenaftyleny, antracenu i fluorantenu, których stężenia końcowe w osadach kontrolnych i z dodatkiem azotanów były na tym samym poziomie.

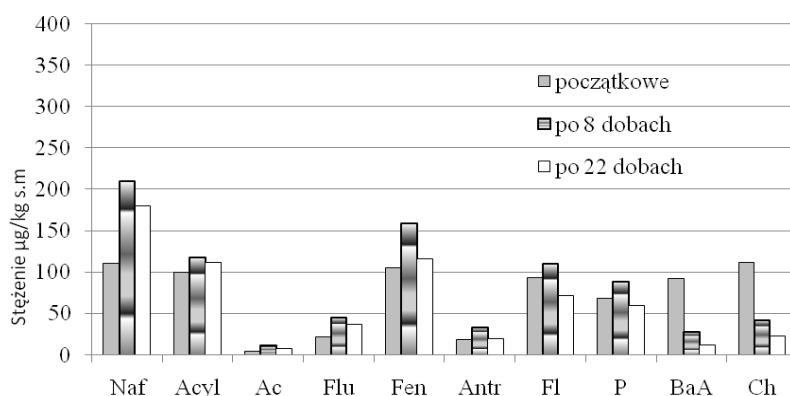


Rys. 1. Zmiany ilościowe WWA w osadach kontrolnych



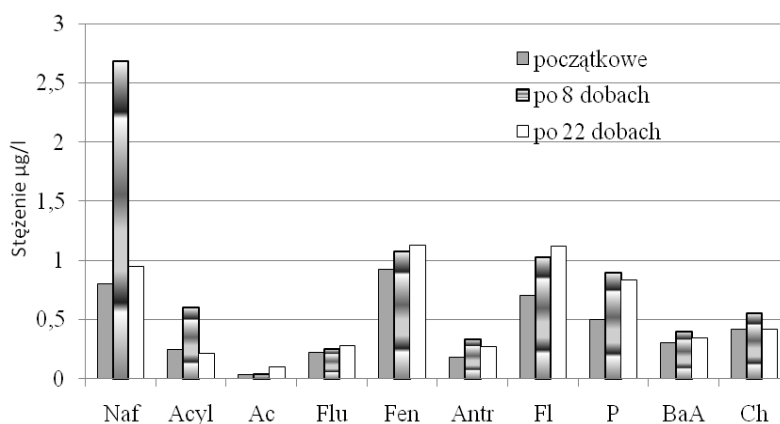
Rys. 2. Zmiany ilościowe WWA w osadach z dodatkiem azotanu(V) sodu

W osadach, w których zahamowano aktywność mikroorganizmów (próbki z dodatkiem azydki sodu), zaobserwowano wahania stężenia sumarycznego badanych związków. Końcowe sumaryczne stężenie 10 WWA wynosiło 640 µg/kg s.m. Na rysunku 3 przedstawiono przebieg zmian ilościowych badanych węglowodorów. W odniesieniu do zawartości początkowej sumaryczne stężenie końcowe było mniejsze o 12%. Największy ubytek, bo sięgający 57%, zanotowano w przypadku benzo(a)antracenu i chryzenu. Są to węglowodory o największej, spośród badanych, wartości współczynnika podziału oktanol/woda, co świadczy o utrudniającej ekstrakcję silnej sorpcji tych związków na cząstkach stałych.

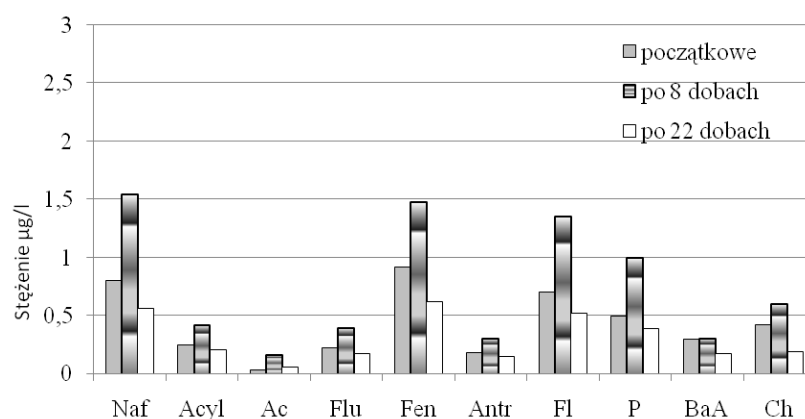


Rys. 3. Zmiany ilościowe WWA w osadach z dodatkiem azydku sodu

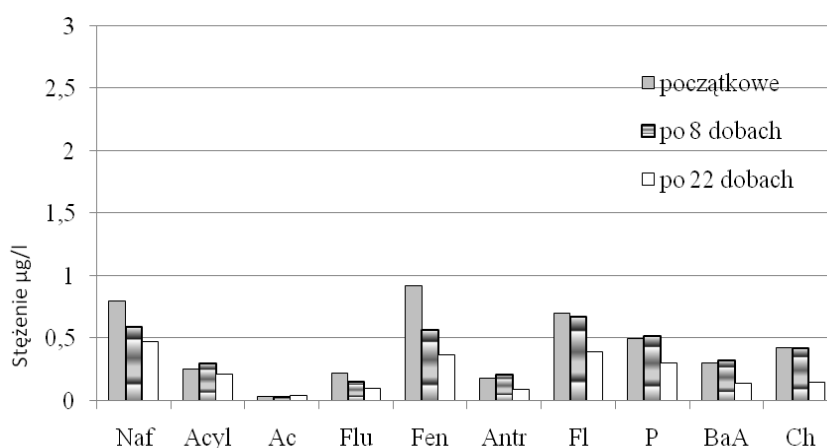
Sumaryczne stężenie początkowe WWA w cieczach nadosadowych wynosiło średnio 4,3 µg/l. Na rysunku 4 przedstawiono zmiany stężenia WWA w cieczach nadosadowych, jakie odnotowano podczas fermentacji. W próbie kontrolnej zaobserwowano prawie 2-krotnie większe stężenie tych związków po 8 dobach inkubacji. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, węglowodory mogą uwalniać się do cieczy podczas fazy hydrolizy. Końcowe stężenie było o 30% większe od początkowego. W obecności azotanów jako akceptora elektronów stężenie sumaryczne WWA w cieczach nadosadowych po 8 dobach fermentacji osadów wynosiło 7,5 µg/l (rys. 5). W końcowej fazie inkubacji nastąpił spadek stężenia WWA w cieczach. Stopień degradacji WWA w cieczach podczas fermentacji osadów wskazuje na to, że w cieczach w warunkach denitryfikacji ubytek sumy WWA wyniósł 31% w odniesieniu do stężenia początkowego i 60% w odniesieniu do stężenia po 8 dobach inkubacji. Potwierdza to możliwość degradacji badanych WWA (z wyjątkiem acenaftyleny) przez bakterie denitryfikacyjne. Przebieg zmian ilościowych WWA w cieczach z dodatkiem azydku sodu przedstawiono na rysunku 6.



Rys. 4. Zmiany ilościowe WWA w cieczach z osadów kontrolnych



Rys. 5. Zmiany ilościowe WWA w cieczach nadosadowych z dodatkiem azotanu(V) sodu



Rys. 6. Zmiany ilościowe WWA w cieczach nadosadowych z dodatkiem azydku sodu

Gdy w osadach zahamowano aktywność mikroorganizmów, obserwowano stopniowe obniżanie stężeń badanych węglowodorów. Przyczyną tego najprawdopodobniej były przemiany abiotyczne, takie jak: sorpcja na cząstkach stałych (odnotowano wzrost stężenia w fazie stałej po 8 dobach - rys. 3), reakcje z innymi składnikami i powstawanie pochodnych, ulatnianie. Końcowe stężenia badanych WWA były o 47% mniejsze niż początkowe.

Wnioski

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań w przyjętych warunkach doświadczenia można sformułować następujące wnioski:

1. Podczas fermentacji w warunkach denitryfikacji zanotowano obniżenie stężenia sumarycznego badanych WWA w fazie stałej o 24% w odniesieniu do

- stężenia po 8 dobach procesu, podczas gdy w osadach kontrolnych stężenie WWA nie zmieniało się.
2. Degradacja WWA w cieczach nadosadowych wynosiła 31% w warunkach denitryfikacji (w kontrolnych próbkach nastąpił wzrost stężenia WWA o 30%).
 3. Gdy zahamowano aktywność mikroorganizmów, nastąpiło obniżenie stężenia WWA w osadach o 12% i w cieczach nadosadowych o 47% w porównaniu z zawartością początkową.

Podziękowania

Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr 4T0D04024 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych oraz BS-402-301/07/R.

Literatura

- [1] Bernal-Martinez A., Carrere H., Patureau D., Delgenes J-P., Ozone pre-treatment as improver of PAH removal during anaerobic digestion of urban sludge, *Chemosphere* 2007, 68, 1013-1019.
- [2] Chang B.V., Chang S.W., Yuan S.Y., Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in sludge, *Advances in Environmental Research* 2003, 7, 623-628.
- [3] Hallberg R., Trepte B., Bioremediation of PAH polluted soils: column studies, *Soils and Sediments* 2003, 1, 21-27.
- [4] Haftka J.J.H., Govers H.A.J., Parsons J.R., Influence of temperature and origin of dissolved organic matter on the partitioning behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2010, 17, 1070-1079.
- [5] Weissenfelds W.D., Klewer H.J., Langhoff J., *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, 36, 689-696.
- [6] Perez S., Guillamon M., Barcelo D., Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants, *Journal of Chromatography* 2001, 938, 57-65.
- [7] Miede C., Bouzige M., Nicol S., Dugay J., Pichon V., Hennion M.C., Selective immunoclean-up followed by liquid or gas chromatography for the monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban waste water and sewage sludges used for soil amendment, *Journal of Chromatography* 1999, 859, 29-39.
- [8] Hamzawi N., Kennedy K.J., McLean D.D., Anaerobic digestion of co-mingled municipal solid waste and sewage sludge, *Water Science Technology* 1998, 38.
- [9] Włodarczyk-Makuła M., The loads of PAHs in wastewater and sewage sludge of municipal Treatment Plant, *Polycyclic Aromatic Compounds* 2005, 25, 183-194.
- [10] Włodarczyk-Makuła M., PAHs balance in solid and liquid phase during fermentation process of sewage sludge, *Journal of Environmental Science and Health* 2008, Part A, 14, 1602-1609.
- [11] McNally D.L., Mihelcic J.R., Lueking D.R., Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions, *Chemosphere* 1999, 6, 1313-1321.
- [12] Mihelcic J.R., Luthy D.G., Degradation of PAH compounds under various redox conditions in soil-water systems *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 54, 1188-1198.
- [13] Hermanowicz W., Dojlido J., Zerbe J., Dożański W., Koziorowski B., *Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków*, Wydawnictwo Arkady, Warszawa 2003.

- [14] Enell A., Reichenberg F., Warfvinge P., Ewald G., A column method for determination of leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged contaminated soil, *Chemosphere* 2004, 54, 707-715.
- [15] Wolska L., Rawa-Adkonis M., Namieśnik J., Determining PAHs and PCBs in aqueous samples: finding and evaluating sources of error, *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 1389-1397.

Quantity Changes of PAHs in Sewage Sludge and in Supernatants during Fermentation Process under Denitrification Conditions

The study expands on the changes of PAHs in sewage sludge and supernatants under nitrate reducing conditions as well as during anaerobic digestion. Raw and digested sludge samples used in the experiment were collected from a municipal wastewater treatment plant receiving both domestic and industrial effluents. Mixed sludge samples were incubated in dark at 36°C. As required for denitrification NaNO_3 was added to the mixed sludge. For comparison abiotic samples with sodium azide were also prepared. PAHs concentration was determined before incubation, after 8 days and after 22 days of incubation. Qualification and quantification of 2-, 3- and 4-ring PAHs (according to EPA recommendation) was carried out by gas chromatography - mass spectrometry. Determination of PAHs was done in sewage sludge and in supernatants simultaneously. Over 22 days of anaerobic digestion changes of PAH total concentration in both sewage sludge and supernatants were observed. During hydrolysis of organic compounds (first phase of fermentation) in the control samples (in sewage sludge and in supernatants) the increase in the concentration of PAHs occurred (especially for naphthalene and 3-ring PAHs). The concentration changes of individual hydrocarbons were different. The sum of concentrations of 10 PAHs in sewage sludge was reduced by 22% on average under nitrate-reducing conditions after 22 days. The concentration of PAHs in control samples of sewage sludge was higher than the initial concentration. In the supernatants the concentration of PAHs was reduced by 31% on average under nitrate-reducing conditions. The contribution of abiotic processes in the removal of PAHs in the supernatants was significant. In the samples with the inhibited activity of microorganisms the decreases of PAHs concentration was equal 47%.

Keywords: PAHs, concentration, sewage sludge, GC-MS, denitrification conditions