

**Doroła NOWAK**

Politechnika Częstochowska, Wydział Inżynierii Środowiska i Biotechnologii  
Instytut Inżynierii Środowiska  
ul. Brzeźnicka 60a, 42-200 Częstochowa  
e-mail: dnowak@is.pcz.czest.pl

## Zastosowanie ultradźwięków do odkażania osadów ściekowych

Szerokie możliwości stosowania technik ultradźwiękowych skłaniają do badań nad możliwościami zastosowania tego czynnika w różnych dziedzinach gospodarki. Destrukcyjne działanie ultradźwięków na układy biologiczne może być wykorzystane do pozbywania się niepożądanych mikroorganizmów z danego środowiska, np. osadów ściekowych, które jako nieodłączny produkt oczyszczania ścieków są koncentratem bardzo zróżnicowanej mikroflory patogennej. W artykule przedstawiono wyniki badań nad wpływem pola ultradźwiękowego na wybrane bakterie w osadzie przefermentowanym. W badaniach analizowano zmiany w liczności bakterii mezofilowych, bakterii laktozo-dodatnich i laktozo-ujemnych oraz w odniesieniu do takich gatunków, jak *Enterococcus faecalis* oraz *Clostridium perfringens*. W badaniach zastosowano dezintegrator ultradźwiękowy o częstotliwości 22 kHz i amplitudzie 16  $\mu\text{m}$ . Próby osadu poddano działaniu pola ultradźwiękowego w czasie 10 i 30 minut. Stopień unieszkodliwienia mikroorganizmów zależał od czasu nadźwiękawiania oraz był zróżnicowany w zależności od badanych bakterii.

**Słowa kluczowe:** osady ściekowe, niszczenie bakterii, ultradźwięki

Dysproporcja między rozwojem technicznym a wydolnością środowiska jest jedną z podstawowych przyczyn poważnych zakłóceń w kształtowaniu równowagi biologicznej ekosystemów. Tylko harmonijne współdziałanie człowieka z przyrodą jest gwarantem różnorodności biologicznej i właściwego użytkowania elementów środowiska. Jednym z kluczowych problemów do rozwiązania w aspekcie zrównoważonego rozwoju jest właściwe przetwarzanie i wykorzystanie odpadów, w tym osadów ściekowych. W wielu przypadkach uzasadnione ekologicznie stosowanie ustabilizowanych osadów ściekowych na powierzchni Ziemi m.in. do makroniwelacji, rekultywacji lub nawożenia, ze względu na zasobność osadów w cenne związki nawozowe, może przyczyniać się do rozprzestrzeniania zanieczyszczeń zawartych w odpadach. Zagrożeniem dla środowiska naturalnego jest zawartość niebezpiecznych związków chemicznych, tj.: metali ciężkich, toksycznych związków organicznych, w tym PCB, WWA czy substancji ropopochodnych [1-4], oraz niepewny stan sanitarny osadów [5-8]. Warto też zwrócić uwagę na nowy rodzaj odpadów, jakie powstają w wyniku coraz powszechniej stosowanych nanomateriałów w bardzo wielu gałęziach gospodarki. Są to np. nanocząsteczki srebra, miedzi, cynku wykorzystywane w produkcji paliw, farb, lakierów, odzieży,

kosmetyków oraz opakowań do żywności [9-11], które, trafiając do oczyszczalni ścieków, przedostają się do osadów ściekowych [12, 13].

Obok zagrożeń ze strony różnych substancji chemicznych równie niebezpieczna jest obecność bardzo zróżnicowanej biocenozy mikroorganizmów. Ujednoczona analiza sanitarna osadów ściekowych napotyka na szereg trudności związanych z różnorodnością czynników, które determinują skład mikrobiologiczny ścieków, a w konsekwencji osadów. Zaliczyć do nich należy obszar, z jakiego odbierane są ścieki oraz wielkość i stan zdrowotny populacji [6, 7]. Często można spotkać się z opinią, że rzeczywista zawartość i różnorodność patogenów może być o wiele większa niż wynikająca z uzyskanych rezultatów badań [14]. Na poziom wykrywalności mikroorganizmów mogą mieć wpływ stosowane techniki namnażania, zbyt mała - poniżej poziomu wykrywalności - liczebność osobników oraz osłabienie fizjologiczne na skutek procesów przeróbki osadów, co może utrudniać namnażanie w warunkach laboratoryjnych. W związku z tym osady ściekowe wymagają stałej obserwacji i oceny, w szczególności wtedy, gdy są stosowane na gruntach ornych. Należy także podkreślić, że obecne w ściekach i osadach ściekowych patogeny są źródłem szkodliwych oddziałujących bioaerozoli, które mogą tworzyć się podczas napowietrzania ścieków oraz podczas procesów przeróbki osadów ściekowych [15], co podnosi ryzyko kontaktu pracowników oczyszczalni zarówno z samymi patogenami, jak i toksycznymi produktami ich metabolizmu, np. mykotoksynami lub toksynami bakteryjnymi.

Powszechnie stosowana fermentacja metanowa jako proces stabilizacji osadów przede wszystkim umożliwia rozkład materii organicznej oraz zmniejsza uciążliwości zapachowe i objętościowe, nie przyczyniając się do uzyskania produktu bezpiecznego pod względem sanitarnym. Sposobem, który daje dobre efekty higienizacyjne, jak również stabilizuje dodatkowo osady, jest wapnowanie [16-18]. Inne metody, jak kompostowanie czy pasteryzacja, choć skuteczniejsze od fermentacji metanowej, to wymagają znacznych nakładów energetycznych.

Problemy, jakie wiążą się z przeróbką i bezpiecznym zagospodarowaniem osadów ściekowych, implikują do poszukiwania nowych lub udoskonalania stosowanych metod w przygotowaniu osadów. Do takich zabiegów należy zaliczyć wspomaganie procesu stabilizacji beztlenowej lub procesów odwadniania osadów falami ultradźwiękowymi [19]. Ultradźwięki, czyli fale o wysokiej częstotliwości (powyżej 20 kHz), wprowadzane do ośrodka płynnego powodują zjawisko kawitacji, polegające na powstawaniu w cieczy pulsujących pęcherzyków próżniowych wypełnionych parą nasyconą lub gazem rozpuszczonym w cieczy. Pęcherzyki kawitacyjne mogą rozrastać się i pulsować, lub zapadać w fazie zagęszczenia fali i być źródłem niszczących fal udarowych. Zjawiska te mają szczególne znaczenie w układach biologicznych, a efekty tych oddziaływań zależą od właściwości pola ultradźwiękowego. Fale o niskiej intensywności mogą przyspieszać metabolizm komórki poprzez poprawę przenikania różnych substratów przez membrany komórkowe i zwiększać szybkość transferu substratu do centrum aktywnego enzymu. Natomiast fale ultradźwiękowe o wyższej intensywności powodują denaturację i zniszczenie aktywności biokatalizatorów, zmiany ładunku na powierzchni

komórek oraz przerwanie i fragmentację błony komórkowej. Powyższe fakty są przesłanką do szerokiego wykorzystania tego czynnika w procesach biotechnologicznych [20-23] oraz jako wspomagającego procesy dezynfekcji wody [24]. Znajomość faktu destabilizacji membran komórkowych i uwalniania enzymów przez fale ultradźwiękowe jest wykorzystywane także we wstępnej obróbce osadów ściekowych, w tym osadu nadmiernego w celu dezintegracji komórek mikroorganizmów i uwolnienia enzymów. Efektem tego jest przyspieszenie rozkładu materii organicznej oraz wzrost produkcji biogazu podczas fermentacji metanowej [25-28]. Niszczące działanie ultradźwięków na komórki żywych organizmów może być także wykorzystane do pozbywania się niepożądanych drobnoustrojów z różnych środowisk [29-31].

W związku z powyższym podjęto badania nad możliwością wykorzystania fal ultradźwiękowych do poprawy stanu sanitarnego osadów ściekowych po procesie fermentacji metanowej. Skuteczność oddziaływania pola ultradźwiękowego oceniono na podstawie ogólnej liczby bakterii mezofilowych oraz wskaźników kałowego zanieczyszczenia, tj.: wartości miana *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, oraz liczebności pałeczek laktozo-dodatnich oraz laktozo-ujemnych. Bakterie należące do grupy laktozo-dodatnich to przede wszystkim rodzaj *Escherichia*, która jest Gram-ujemną pałeczką, fermentującą laktozę, stanowi naturalną mikroflorę jelita grubego człowieka i innych zwierząt stałocieplnych. Większość szczepów *Escherichia coli* to komensale, które wspomagają procesy trawienne oraz uczestniczą w syntezie niektórych witamin. Wśród nich mogą jednak znaleźć się patogenne dla ludzi enterokrwotoczne szczepy 0157:47, które powodują krwawe biegunki oraz groźny zespół hemolityczno-mocznicowy [32]. Do grupy bakterii laktozo-ujemnych należą rodzaje *Salmonella* i *Shigella*, które w odróżnieniu od pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) nie fermentują laktozy, co jest wykorzystywane w różnicowaniu i diagnozowaniu tych bakterii. Bakterie *Salmonella* sp. należą do bezwzględnych patogenów, zmiany chorobowe najczęściej ograniczają się do przewodu pokarmowego, lecz możliwy jest uogólniony proces chorobowy, który może prowadzić do zakażenia narządów wewnętrznych i posocznicy [33]. Jak podaje Główny Inspektorat Sanitarny, mimo obserwowanego spadku liczby bakteryjnych zatruc i zakażeń pokarmowych, nadal najczęstsze są zakażenia wywołane odzwierzęcymi pałeczkami jelitowymi z rodzaju *Salmonella*.

*Clostridium perfringens* to Gram-dodatnia, ściśle beztlenowa wytwarzająca przetrwalniki laseczka, która występuje powszechnie w glebie i ściekach oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Określone szczepy, które dzieli się w zależności od produkowanych toksyn na pięć toksynotypów (A,B,C,D,F), wytwarzają enterotoksyny, które są powodem poważnych zatruc pokarmowych lub mogą powodować zakażenia przyranne, wytwarzając enzymy proteolityczne, wywołujące zgorzel gazową [34]. Bakterie z gatunku *Enterococcus faecalis*, podobnie jak *Escherichia coli*, stanowią część flory jelitowej człowieka i nie stanowią zagrożenia, natomiast gatunki patogenne mogą wywoływać zapalenie opon mózgowych, wsierdzia oraz płuc [35].

W pracy skoncentrowano się na zanieczyszczeniach bakteriologicznych, ale, jak pokazują wyniki wcześniejszych badań własnych [8], osady ściekowe, zarówno surowe, jak i po procesie fermentacji metanowej, są dogodnym środowiskiem dla innych groźnych mikroorganizmów, w tym grzybów patogennych i toksynotwórczych.

## 1. Materiały i metodyka

Do badań użyto osadów ściekowych z Miejskiej Oczyszczalni Ścieków, które były pobierane po procesie mezofilowej fermentacji metanowej. Z każdej pobranej partii osadów przeprowadzono 4 serie badań, wykonując oznaczenia bakteriologiczne w próbie kontrolnej oraz po zastosowaniu pola ultradźwiękowego. Nadźwiękawianie osadu prowadzono w objętości 100 ml przy użyciu dezintegratora ultradźwiękowego UD-20 przy stałej częstotliwości 22 kHz i amplitudzie 16  $\mu\text{m}$ . Czas nadźwiękawiania osadu wynosił 10 i 30 minut.

### Oznaczenia bakteriologiczne

Przed posiewami odważono 10 g osadu i wytrząsano w 90 ml soli fizjologicznej przez 15 min. Z tak przygotowanego roztworu wykonano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń i wysiewano materiał w objętości 0,1 ml na odpowiednie podłoża ogólne oraz diagnostyczne. Hodowlę prowadzono w sześciu równoległych powtórzeniach.

#### – Ogólna liczba bakterii mezofilowych

Hodowlę bakterii prowadzono na podłożu agarowym MPA przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Po odpowiednim czasie inkubacji zliczano wyrosłe kolonie. Wynik podano jako liczbę jtk/g osadu.

#### – Oznaczenie miana *Enterococcus faecalis* oraz *Clostridium perfringens*

W celu oznaczenia miana *Enterococcus faecalis* oraz *Clostridium perfringens* badany materiał wysiewano z rozcieńczeń w zakresie  $10^{-1} \div 10^{-8}$  dla prób kontrolnych oraz  $10^{-1} \div 10^{-6}$  dla prób po zastosowaniu ultradźwięków. Dla bakterii *Enterococcus faecalis* zastosowano płynne podłoże z azydkiem sodowym APB. Obecność bakterii stwierdzano na podstawie zmętnienia i zmiany zabarwienia podłoża z czerwonej na żółtą. Wszystkie próby dodatnie były potwierdzane na podłożu z fioletem etylowym (AFE).

W przypadku bakterii z rodzaju *Clostridium perfringens* próby przed posiewem były inkubowane przez 15 minut w łaźni wodnej w temperaturze 80°C w celu usunięcia form wegetatywnych, a następnie wysiewane na podłoże Wilsona-Blaira. Obecność bakterii z rodzaju *Clostridium perfringens* stwierdzano na podstawie obecności czarnych kolonii wewnątrz podłoża. W obu przypadkach hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

#### – Bakterie laktozo-ujemne i laktozo-dodatnie

Do identyfikacji bakterii zastosowano wybiórczy agar MacConkeya, który umożliwia zróżnicowanie bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w oparciu o zdolność do wykorzystania laktozy. Laktozo-ujemne, w tym *Salmonella* i *Shigella*,

tworzą bezbarwne, przejrzyste kolonie, natomiast czerwone kolonie tworzą bakterie z rodzaju *Escherichia coli*, mające zdolność do wykorzystania laktozy.

## 2. Wyniki i dyskusja wyników

W tabeli 1 zestawiono wyniki analizy ilościowo-jakościowej osadów przefermentowanych z czterech serii badań. Wartości liczbowe w tabeli są średnią arytmetyczną z 6 równoległych powtórzeń.

Tabela 1. Wyniki analizy bakteriologicznej badanych osadów przefermentowanych  
Table 1. Results of bacteriological analyze of sewage sludge

Oznaczenie	Seria I	Seria II	Seria III	Seria IV	Średnia
Liczba bakterii mezofilowych jtk/g	$38 \times 10^4$	$94 \times 10^4$	$155 \times 10^5$	$375 \times 10^4$	$514 \times 10^4$
Liczba bakterii laktozo-dodatnich (L+), jtk/g	$105 \times 10^2$	$20 \times 10^2$	$410 \times 10^2$	$25 \times 10^2$	$140 \times 10^2$
Liczba bakterii laktozo-ujemnych (L-), jtk/g	$150 \times 10^2$	$300 \times 10^2$	$250 \times 10^3$	$590 \times 10^2$	$332,5 \times 10^2$
Miano <i>Enterococcus faecalis</i>	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$
Miano <i>Clostridium perfringens</i>	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$

Uzyskane wyniki analiz mikrobiologicznych wskazują, że badane osady są odpadami silnie zanieczyszczonymi pod względem mikrobiologicznym i stwarzają potencjalne zagrożenie sanitarne. Oznacza to, że mikroorganizmy, jakie dopływają do oczyszczalni ścieków, nie są całkowicie unieszkodliwione w trakcie mechanicznego i biologicznego oczyszczania ścieków, w efekcie trafiają do osadów surowych i, jak pokazują wyniki badań (tab. 1), przeżywają najczęściej stosowane procesy stabilizacyjne. Należy także podkreślić, że liczebność bakterii w zależności od próby jest zróżnicowana i waha się średnio w zakresie od  $38 \times 10^4$  (I seria) do  $155 \times 10^5$  (III seria). Najbardziej zanieczyszczone były próby osadu z III serii badań, o czym świadczą niskie wartości miano oznaczanych wskaźników kałowego zanieczyszczenia, czyli miano *Enterococcus faecalis* oraz *Clostridium perfringens*. Bakterie z rodzaju *Enterococcus faecalis* były wykrywane jeszcze w 0,00001 g osadu, a *Clostridium perfringens* w 0,0001g osadu. Próby z tej serii badań charakteryzowały się także znaczną liczebnością bakterii mezofilowych oraz bakterii laktozo-dodatnich i laktozo-ujemnych (tab. 1).

Analizując wyniki badań nad wpływem ultradźwięków na oznaczane bakterie, należy stwierdzić, że zgodnie z założeniami ultradźwięki wpływają destrukcyjnie na badane mikroorganizmy (tabele 2, 3).

Tabela 2. Wpływ pola ultradźwiękowego na liczebność bakterii oraz wartość miana *Clostridium perfringens* i *Enterococcus faecalis*Table 2. Influence of sonication on the number of bacteria and titer value of *Clostridium perfringens* and *Enterococcus faecalis*

Oznaczenie	Nr serii	Próba kontrolna $m_0$	$m_{10}$	$m_{30}$
Liczba bakterii mezofilowych, jtk/g	I	$38 \times 10^4$	$66 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$
	II	$94 \times 10^4$	$20 \times 10^4$	$10 \times 10^3$
	III	$155 \times 10^5$	$45 \times 10^5$	$33 \times 10^3$
	IV	$375 \times 10^4$	$78 \times 10^4$	$29 \times 10^3$
Liczba bakterii laktozo-dodatnich(L+), jtk/g	I	$105 \times 10^2$	250	brak wzrostu
	II	$20 \times 10^2$	100	brak wzrostu
	III	$410 \times 10^2$	300	brak wzrostu
	IV	$25 \times 10^2$	brak wzrostu	brak wzrostu
Liczba bakterii laktozo-ujemnych (L-), jtk/g	I	$150 \times 10^2$	brak wzrostu	brak wzrostu
	II	$300 \times 10^2$	$83 \times 10^2$	brak wzrostu
	III	$250 \times 10^3$	630	brak wzrostu
	IV	$590 \times 10^2$	brak wzrostu	brak wzrostu
Miano <i>Enterococcus faecalis</i>	I	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
	II	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
	III	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
	IV	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$
Miano <i>Clostridium perfringens</i>	I	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$
	II	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$
	III	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$
	IV	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$

Redukcja mikroorganizmów zależała od czasu nadźwiękawiania i była zróżnicowana w zależności od badanych bakterii. W tabeli 2 podano liczebność bakterii oraz wartość miana *Enterococcus faecalis* i *Clostridium perfringens* w próbach kontrolnych oraz po zadziałaniu ultradźwięków, natomiast w tabeli 3 przedstawiono efektywność niszczenia bakterii z czterech serii badań, w zależności od czasu sonifikacji. W przypadku bakterii mezofilowych skuteczność niszczenia mikroorganizmów w zależności od serii badań wynosiła od 70,96 do 82,63% dla  $t_n = 10$  minut, osiągając średnio 77,87%. Trzykrotne wydłużenie czasu działania ultradźwięków spowodowało wzrost efektywności niszczenia w tej grupie bakterii do ponad 99% w przypadku VI serii badań, w pozostałych wahała się od 97,87 do 98,93%, średnio wynosząc 98,6% (tab. 3). W przypadku konkretnych bakterii wskaźnikowych z grupy laktozo-dodatnich (L+), do których należą bakterie z rodzaju *Escherichia*, znaczną ich redukcję uzyskano przy krótszym czasie sonifikacji  $t_n = 10$  minut. W czwartej serii badań nie zaobserwowano wzrostu tych bakterii po

zastosowaniu pola ultradźwiękowego, a w pozostałych 3 seriach efektywność niszczenia była bardzo zbliżona i średnio wynosiła 99,5% (tab. 3). Natomiast w żadnej z czterech serii badań nie uzyskano wzrostu mikroorganizmów z tej grupy po wydłużeniu czasu nadźwiękawiania do 30 minut. Podobne rezultaty uzyskali Jean i inni [36], badając przeżywalność bakterii grupy *coli* oraz *Escherichia coli* w osadach ściekowych, po zastosowaniu ultradźwięków.

W przypadku bakterii laktozo-ujemnych, do których należą bakterie z rodzajów *Salmonella* i *Shigella*, zarówno w I, jak i VI serii uzyskano całkowite wyeliminowanie tych bakterii po 10 minutach stosowania ultradźwięków, natomiast w dwóch pozostałych redukcja mikroorganizmów wyniosła średnio 86% (tabele 2, 3). Podobnie jak w przypadku bakterii laktozo-dodatnich, obserwowano całkowite unieszkodliwienie tych bakterii po wydłużeniu czasu działania ultradźwięków do 30 minut (tabele 2, 3).

Tabela 3. **Efektywność niszczenia mikroorganizmów z zależności od czasu działania ultradźwięków**

Table 3. **Efficiency of the destruction of microorganisms depending on the time of sonication**

Oznaczenie	Czas nadźwiękawiania	Seria I	Seria II	Seria III	Seria IV
Bakterie mezofilowe jtk/g	tn = 10 min	82,63%	78,7%	70,96%	79,2%
	tn = 30 min	98,47%	98,93%	97,87%	99,22%
Bakterie laktozo-dodatnie (L+) jtk/g	tn = 10 min	99,76%	99,5%	99,26%	100%
	tn = 30 min	100%	100%	100%	100%
Bakterie laktozo-ujemne (L-) (jtk/g)	tn = 10 min	100%	72,3%	99,74	100%
	tn = 30	100%	100%	100%	100%

Analizując uzyskane wyniki badań nad wpływem ultradźwięków na wybrane bakterie w osadach ściekowych, należy stwierdzić, że większą odpornością na działanie pola ultradźwiękowego charakteryzowały się bakterie Gram-dodatnie z rodzaju *Clostridium perfringens* i *Enterococcus faecalis*. Mimo wydłużenia czasu sonifikacji do 30 minut nadal stwierdzano obecność tych bakterii w 0,01 i 0,001 grama badanych osadów (tab. 2). Natomiast działanie pola ultradźwiękowego przez 10 minut w przypadku I, II, VI serii badań nie polepszyło stanu sanitarnego osadów pod względem zawartości tych bakterii, bowiem wartość miana *Clostridium perfringens* była taka sama jak w próbie kontrolnej i wynosiła  $10^{-3}$  (tab. 2). Tylko w III serii badań zaobserwowano wzrost miana *Clostridium perfringens*, uzyskując  $10^{-3}$  dla tn = 10 min i  $10^{-2}$  dla tn = 30 min. W przypadku bakterii *Enterococcus faecalis* także nie uzyskano całkowitego zniszczenia tych bakterii. Stosując dłuższy czas nadźwiękawiania (tn = 30 min), nadal były obecne w 0,001 g osadów (tab. 3). Przy krótszym czasie działania polem ultradźwiękowym (tn = 10 min) uzyskano wzrost miana tych bakterii w III i IV serii badań, natomiast

w dwóch pozostałych wartości miana była na tym samym poziomie co w próbach kontrolnych. Potwierdza to doniesienia innych autorów na temat wrażliwości bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Dracopolou i inni [37], badając wpływ ultradźwięków na bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne w ściekach, uzyskiwali stopień niszczenia *Clostridium perfringens* w zakresie 66÷84%, natomiast w przypadku bakterii Gram-ujemnych, w tym z grupy *coli* stopień niszczenia tych bakterii był zdecydowanie wyższy i wynosił 99,2÷99,7% w ciągu 60 minut i przy częstotliwości 24 kHz. Podobne zależności w odporności bakterii na działanie ultradźwięków obserwowali Neisi Blume [38] oraz Gholami i inni [39], wykorzystując ultradźwięki do dezynfekcji ścieków uzyskali mniejszą skuteczność niszczenia Gram-dodatnich paciorkowców kałowych w stosunku do Gram-ujemnych bakterii grupy *coli*. Odporność bakterii Gram-dodatnich wynika z grubszej ściany komórkowej oraz szczelniej przylegającej warstwy peptydoglikanu niż u bakterii Gram-ujemnych. Jeżeli chodzi o przetrwalniki, to różnią się one pod względem budowy i składu chemicznego od form wegetatywnych, co daje im unikalne właściwości w odporności na stresy środowiskowe oraz środki dezynfekcyjne i czynniki sterylizacyjne, przez co stają się trudniejsze do zniszczenia.

## Podsumowanie

Wyniki badań potwierdzają, że osady ściekowe są koncentratem patogennych mikroorganizmów, a stosowana najczęściej fermentacja metanowa, jako proces stabilizujący osady, nie gwarantuje produktu bezpiecznego pod względem sanitarnym. Badane osady w każdej z serii badań charakteryzowały się znaczną liczebnością bakterii, w tym kałowych bakterii wskaźnikowych, zarówno Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Zjawiska, jakie towarzyszą wprowadzeniu ultradźwięków do osadka, którym były próby osadów ściekowych, powodują inaktywację bakterii, a efektywność niszczącego działania ultradźwięków zależała od czasu działania oraz była zróżnicowana w zależności od badanych bakterii. Bardziej odporne na działanie pola ultradźwiękowego były Gram-dodatnie, w tym przetrwalnikujące laseczki z rodzaju *Clostridium perfringens* oraz paciorkowce *Enterococcus faecalis*. Mimo wydłużenia czasu nadźwiękowania do 30 minut nie uzyskano całkowitego ich unieszkodliwienia. Zdecydowanie większą wrażliwość na działanie ultradźwięków wykazywały bakterie Gram-ujemne z rodzaju *Escherichia* oraz *Salmonella* i *Shigella*, których całkowite unieszkodliwienie lub bliskie 100% uzyskiwano przy krótszym czasie nadźwiękowania. Uzyskane wyniki badań wskazują, że, stosując odpowiednie parametry pola ultradźwiękowego, można uzyskać poprawę stanu sanitarnego osadów ściekowych.

## Podziękowania

*Praca została wykonana w ramach BS/PB-401-301/13.*



## Literatura

- [1] Rosik-Dulewska C., Głowala K., Karwaczyńska U., Robak J., Elution of heavy metals from granulates produced from municipal sewage deposits and fly-ash of hard and brown coal in the aspect of recycling for fertilization purposes, *Archives of Environmental Protection* 2008, 34, (2), 63-67.
- [2] Dąbrowska L., Rosińska A., Janosz-Rajczyk M., Heavy metals and PCBs in sewage sludge during thermophilic digestion process, *Archives of Environmental Protection* 2011, 37, 3, 3-13.
- [3] Clarke B.O., Porter N.A., Marriott P.J., Balckbeard J.R., Investigating the levels and trends of organochlorine pesticides and polychlorinated biphehyl in sewage sludge, *Environmental International* 2010, 36, 323-329.
- [4] Harrison E.Z., Oakes S.R., Hysell M., Hay A., Organic chemicals in sewage sludge, *Science of Total Environment* 2006, 367, 481-497.
- [5] Strauch D., Pathogenic microorganisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as a fertilizer, *European Water Management* 1998, 1, 12-26.
- [6] Saleem M., Al-Malack M.H., Bukhar A.A., Seasonal variations in the microbial population density present in biological sludge, *Environmental Technology* 2001, 22, 255-259.
- [7] Sahlström L., Aspan A., Bagge E., Danielsson-Tham M.-L., Albiñ A., Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants, *Water Research* 2004, 38, 1989-1994.
- [8] Bień J., Nowak D., Biological composition of sewage sludge in the aspect of threats to the natural environment, *Archives of Environmental Protection* 2014, 40, 4, 79-86.
- [9] Bradley E.L., Castle L., Chaundry Q., Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries, *Trends in Food Science and Technology* 2011, 22, 11, 604-610.
- [10] Li M.R., Sprando R.L., Application of nanotechnology in cosmetics, *Pharmaceutical Research* 2010, 27, 1746-1749.
- [11] Caturvedi S., Dave P.N., Shah N.K., Applications of nano-catalyst in new era, *Journal of Saudi Chemical Society* 2012, 16, 3, 307-325.
- [12] Musee N., Nanowastes and the environment: Potential new waste management paradigm, *Environment International* 2011, 37, 1, 112-28.
- [13] Bojeong K., Park Ch., Murayama M., Hochella M.F., Discovery and characterization of silver sulfide nanoparticles in final sewage sludge products, *Environmental Science and Technology* 2010, 44, 19, 7509-7514.
- [14] Straub T.M., Pepper I.L., Gerba C.P., Hazards from pathogenic microorganisms inland-disposed sewage sludge, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 1993, 132, 55-91.
- [15] Soroka P.M., Cyprowski M., Sowiak M., Szadkowska-Stańczyk I., Occupational exposure to mycotoxins in various branches of industry, *Medycyna Pracy* 2008, 59, 4, 333-345.
- [16] Bina B., Movahedian H., Kord I., The effect of lime stabilization on the microbiological quality of sewage sludge, *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2004, 1, 1, 34-38.
- [17] Marcinkowski T., Alkaline stabilization of municipal sewage sludges, *Scientific Papers of Institute of Environment Protection Engineering of the Wrocław University of Technology* 2004, 76, Monographs, 4.
- [18] Czechowski F.R., Marcinkowski T., Sewage sludge stabilisation with calcium hydroxide: Effect on physicochemical properties and molecular composition, *Water Research* 2006, 40, 1895-1905.
- [19] Wolski P., Zawieja I., Effect of ultrasound field on dewatering of sewage sludge, *Archives of Environmental Protection* 2012, 38, 2, 25-31.
- [20] Sinisterra J.V., Application of ultrasound to biotechnology: An overview, *Ultrasonics* 1993, 30, 3, 180-185.

- [21] Chisti Y., Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity, *Trends in Biotechnology* 2003, 21, 2, 89-93.
- [22] Tumowa L., Tuma J., Hendrychová H., Effect of ultrasound on the isoflavonoid production in *Genista tinctoria* L. suspension cultures, *Farmacognosy Magazine* 2014, 10, 2, 425-429.
- [23] Ashokkumar M., Applications of ultrasound in food and bioprocessing, *Ultrasonics Sonochemistry* 2015, 25, 17-23.
- [24] Doosti M.R., Kargar R., Sayadi M.H., Water treatment using ultrasonic assistance: A review, *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 2012, 2, 96-110.
- [25] Lee I., Han J.H., The effects of waste-activated sludge pretreatment using hydrodynamic cavitation for methane production, *Ultrasonics Sonochemistry* 2013, 20, 1450-1455.
- [26] Zhang P., Zhang G., Wang W., Ultrasonic treatment of biological sludge: Floc disintegration, cell lysis and inactivation. *Bioresource Technology* 2007, 98, 207-210.
- [27] Zielewicz E., Indicators of ultrasonic disintegration of sewage sludge, *Polish Journal of Environmental Studies* 2010, Series of monographs, 2, 268-272.
- [28] Machnicka A., Grubel K., Suschka J., The use hydrodynamic disintegration as a means to improve anaerobic digestion of activated sludge, *Water SA* 2009, 35, 129-132.
- [29] Wolny L., Bień J., Nowak D., Conditioning and decontamination of sewage sludge in sonification process, *Sludge Management Entering the 3<sup>rd</sup> Millenium Conference 2001, Taipei, Taiwan* 462-469.
- [30] Gogate P., Application of cavitational reactors for water disinfection: Current status and path forward, *Journal of Environmental Management* 2007, 85, 801-815.
- [31] Jin X., Li Z., Xie L., Zhao Y., Wang T., Synergistic effect of ultrasonic pre-treatment combined with UV irradiation for secondary effluent disinfection, *Ultrasonics Sonochemistry* 2013, 20, 1384-1389.
- [32] Gyles C.L., Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview, *Journal of Animal Science* 2007, 85, 45-62.
- [33] Santos R.L., Zhang S., Tsois R.M., Hingsley R.A., Adams L.G., Bäumlér A.J., Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever, *Microbes and Infection* 2001, 3, 1335-1344.
- [34] Sirous M., Namaki S., Mirshafiey A., Clostridia, *Journal of Chinese Clinical Medicine* 2009, 4, 35-47.
- [35] Ryan K.J., Ray C.G., Ahmad N., Drew W.L., Plorde J., Sherris Medical Microbiology, 6th ed. McGraw Hill Education, 2014.
- [36] Jean D., Chang B., Liao G., Tsou G., Lee D., Reduction of microbial density level in sewage sludge through pH adjustment and ultrasonic treatment, *Water Science and Technology* 2000, 42, 9, 97-102.
- [37] Drakopoulou S., Terzakis S., Fountoulakis M.S., Mantzavinos D., Manios T., Ultrasound-induced inactivation of Gram-Negative and Gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater, *Ultrasonics Sonochemistry* 2009, 16, 5, 629-634.
- [38] Neis U., Blume T., Ultrasonic disinfection of wastewater effluents for high-quality reuse, *IWA Regional Symposium on Water Recycling in Mediterranean Region 2002, Iraklio, Greece*, 26.-29.09.2002.
- [39] Gholami M., Mirzaei R., Mohammadi R., Zarghampour Z., Afshari A., Destruction of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* using low frequency ultrasound technology: a response surface methodology, *Health Scope*, Winter 2014, 3(1), e14213, 1-9.

## Decontamination of Sewage Sludge in Sonification Process)

Significant disproportion between technological development and the capacity of natural environment is one of the major causes of serious disturbances in shaping the biological equilibrium of ecosystems. One of the key issues to be solved in the aspect of sustainable development is efficient processing and utilizing of waste, including sewage sludge. The potential threat of these materials to the natural environment is mainly due to the presence of hazardous chemicals and unsafe sanitary state. The problems associated with the processing and safe managing of sewage sludge resulted in development of new methods or improvement of already existing methods for processing and hygienisation of sewage sludge. These methods include processes that facilitate anaerobic stabilization and ultrasonic dewatering of sewage sludge. The destructive effect of ultrasounds can be also applied to remove pathogenic microorganisms from sewage sludge. The article presents the results of the study on the potential of ultrasounds for the improvement of sanitary state of anaerobically fermented sewage sludge. The efficiency of ultrasonic field was evaluated based on the total number of mesophilic bacteria and the faecal indicators, i.e. the coliform index of *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* and the number of lactose negative and positive rods. The samples of sewage sludge came from the Municipal Waste Water Treatment Plant and were taken after the completion of methane fermentation. Each sewage sludge sample was subjected to 4 series of tests that included bacteriological analyzes in the control and in the samples exposed to the ultrasonic field. Ultrasonication was applied to the volume of 100 ml of sewage sludge by the ultrasonic desintegrator UD-20 at the constant frequency of 22 kHz and the amplitude of 16  $\mu\text{m}$ . The exposure time of sewage sludge samples to the ultrasonic field was 10 min and 30 min. The obtained results of microbiological analyzes indicate that the investigated sewage sludge is contaminated microbiologically and poses potential sanitary threat. Also, the obtained results confirmed the destructive effect of ultrasounds on the investigated groups of bacteria and diverse resistance of microorganisms towards ultrasounds. High resistance towards ultrasounds irrespective of the exposure time was observed for the endospores of *Clostridium*. Diverse resistance was observed between Gram-positive and Gram-negative bacteria. Gram-negative bacteria of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* were more sensitive to the ultrasonic field. The total degradation was obtained at shorter exposure time (i.e. 10 min) whereas gram positive bacteria from *Enterococcus* was observed even when the exposure time was extended to 30 min of ultrasonication. In case of mesophilic bacteria at the exposure time of 10 min the reduction was from 70.96% to 82.63%, and after extending the exposure time the mesophilic bacteria was destroyed in the range of 98.47% to 99.22%.

**Keywords:** sewage sludge, destruction of bacteria, ultrasonication