

Beata Bobek  
Joanna Kandzia  
Aleksandra Smyłła

Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Akademia im. Jana Długosza,  
42-200 Częstochowa, Al. Armii Krajowej 13/15, e-mail: a.smylla@ajd.czyst.pl

## **Obecność mikroorganizmów z rodziny *Enterobacteriaceae* w ściekach oczyszczalni typu Lemna**

**Streszczenie:** Badania mikrobiologiczne ścieków prowadzono w 4 kolejnych seriach, w oczyszczalni typu Lemna w Boronowie w kwietniu i maju 2005 roku. Próbkę do badań pobierano w następujących punktach oczyszczalni: 1. ścieki surowe z piaskownika poziomego, 2. ścieki ze stawu napowietrzanego, 3. ścieki z komory nityfikacyjnej, 4. ścieki na odpływie.

Liczebność potencjalnych bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* określano na podłożu EMB (z eozyną i błękitem metylenowym) oraz na podłożu VRBG (z czerwienią obojętną, fioletem krystalicznym, żółcią i glukozą). Kolonie dominujących bakterii wyrosłe na pożywkach EMB i VRBG izolowano i poddano badaniom w celu potwierdzenia ich przynależności do *Enterobacteriaceae*. Stwierdzono zróżnicowanie liczebności pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* w ściekach surowych, w zależności od serii, od 100 000 do 4 300 000/ cm<sup>3</sup>. W kolejnych etapach oczyszczania ścieków obserwowano zmniejszenie się tej liczebności w ściekach na odpływie od 98,0-99,8 % w poszczególnych seriach.

**Słowa kluczowe:** bakterie, oczyszczanie, ścieki

### **1. Wstęp**

W oczyszczalniach hydrobotanicznych, które są naturalną alternatywą dla technicznych metod oczyszczania ścieków, wyróżnia się systemy oczyszczania takie jak system glebowy z roślinnością i przepływającymi ściekami, system hydrobotaniczny zawierający filtr glebowy i rośliny wodne oraz system wodny z kulturą roślin wolno pływających [1].

Oczyszczalnie z kulturą roślin wolno pływających, w Polsce typu Lemna, są skuteczną metodą oczyszczania ścieków dla wsi i małych osiedli, gdzie zmienność dopływu ścieków do oczyszczalni jest bardzo wysoka [2]. Oczyszczalnie te cechuje prostota i niezawodność działania, bardzo dobra redukcja BZT<sub>5</sub>, ChZT i zawiesiny ogólnej sięgająca 90-98%. Nie wymagają budowy kosztownych urządzeń do mechanicznego odwodnienia osadu, są więc

tańsze w budowie i eksploatacji. Cechuje je bardzo niska energochłonność oraz tania i prawie bezobsługowa eksploatacja [1,2].

Cechą charakterystyczną oczyszczalni typu Lemna jest staw doczyszczający, w którym występuje rzęsa (*Lemna minor*). Na powierzchni stawu zainstalowane są specjalne bariery pływające, służące do stabilizacji i utrzymania równomiernej grubości kożucha rzęsy. Utrzymujący się kożuch rzęsy tworzy warstwę utrudniającą przebieg procesów wymiany tlenowej pomiędzy powietrzem atmosferycznym a ściekami. Rzęsa wodna zapobiega również dużym wahaniom temperatury warstwy ścieków, co stabilizuje przebieg procesów technologicznych. W kolumnie wodnej stawu wytwarzają się trzy strefy: tlenowa, anoksydacyjna i beztlenowa, przy czym strefa beztlenowa stanowi około 65 – 70 % pojemności stawu, co stwarza odpowiednie warunki do denitryfikacji. W okresie zimowym po opadnięciu rzęsy na dno stawu podobną rolę do rzęsy pływającej na powierzchni stawu pełni pokrywa lodowa, a w okresie wczesnowiosennym i późnojesiennym bariery pływające, które nie dopuszczają do mieszania się ścieków utrzymując trzy wyżej wymienione strefy. W stawie doczyszczającym uzyskuje się końcową redukcję BZT<sub>5</sub>, zawiesiny ogólnej, azotu oraz fosforu do poziomu warunków określonych w pozwoleniu wodno – prawnym [2-4].

Stan epidemiologiczny ścieków zależy od ilości obsługiwanych mieszkańców zlewni i ich stanu zdrowia [5]. Wraz ze ściekami bytowo-gospodarczymi, do odbiorników wprowadzane są bakterie występujące stale w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt jak: pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*, paciorkowce kałowe czy laseczki przetrwalnikujące, mogą też znajdować się bakterie będące przyczyną wielu chorób o charakterze żołądkowo-jelitowym [6,7].

W typowych oczyszczalniach biologicznych, z podwyższonym usuwaniem biogenów, redukcja ilości bakterii pochodzenia kałowego waha się od 80- 99,9% [8], jednak ścieki na odpływie nadal zawierają wysoką liczbę bakterii coli typu kałowego, co stanowi istotne zagrożenie dla środowiska [7-9].

Stwierdzono, że oczyszczalnie typu Lemna cechuje bardzo dobra redukcja BZT<sub>5</sub>, ChZT i zawiesiny ogólnej sięgająca 90-98% [2], a ponieważ czystość mikrobiologiczna odprowadzanych ścieków zależy m. in. od sposobu ich oczyszczania [5,8], celem pracy była ocena skuteczności eliminacji przez oczyszczalnię hydrobotaniczną typu Lemna potencjalnych pałeczek jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae* ze ścieków.

## 2. Metodyka badań

Badania prowadzono w hydrobotanicznej oczyszczalni ścieków typu Lemna w Boronowie, która zlokalizowana jest w północno – zachodniej części Boronowa, po wschodniej stronie linii kolejowej prowadzącej z Kalet do Tarnowskich Gór. Oczyszczalnia przyjmuje ścieki od stałych mieszkańców Boronowa, gdzie większość domów jest skanalizowana, jak również z okolicznych wiosek: Huciska, Grojca, Dębowej Góry i Zumpów, skąd ścieki są dowożone beczkowozami [4].

Oczyszczalnia ta składa się z: przepompowni, komory rozprężnej, do której zrzucane są ścieki dowożone, kraty ręcznej, piaskownika poziomego dwukomorowego, stawu napowietrzanego, komory nityfikacji, komory koagulacji, stawu Lemna z hodowlą rzęsy (*Lemna minor*) oraz budowli odpływowej [4].



**Fotografia 1.** Staw Lemna z widocznymi barierami pływającymi

Badania mikrobiologiczne ścieków wykonano w czterech seriach w dniach 4.04.2005, 18.04.2005, 25.04.2005 i 23.05.2005 r. Próbki pobierano w następujących punktach oczyszczalni: 1. ścieki surowe z piaskownika poziomego, 2. ścieki ze stawu napowietrzanego, 3. ścieki z komory nityfikacyjnej, 4. ścieki z budowli odpływowej.

Liczebność potencjalnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* określano na podłożu z eozyną i błękitem metylenowym (EMB) o składzie [g x l<sup>-1</sup>]: pepton 10.0, laktoza 10.0, wodorofosforan dipotasu 2.0, eozyna żółta 0.4, błękit metylenowy 0.065, agar 15.0 [10 ], oraz na podłożu z czerwienią obojętną, fioletem krystalicznym, żółcią i glukozą (VRBG) o składzie [g x l<sup>-1</sup>]:

pepton 7.0, ekstrakt drożdżowy 3.0, glukoza 10.0, NaCl 5.0, sole żółci 1.5, czerwien obojętna 0.03, fiolet krystaliczny 0.002, agar 15,0 [11, 12]. W próbach ścieków oznaczono również bakterie coli termotolerancyjne (NPL) na podłożu z zielenią brylantową, żółcią i glukozą [10].

Z czwartej serii badań izolowano kolonie dominujących bakterii, które po oczyszczeniu poddano testom morfologicznym i biochemicznym wg normy PN-A-04023. 2001 [12], w celu potwierdzenia ich przynależności do rodziny *Enterobacteriaceae* [11]. W badaniach użyto też testów firmy Microgen Bioprodukts: Microgen<sup>TM</sup> GN-ID Identification, oraz API (Biomerieux)[19].

### 3. Wyniki i ich analiza

W czasie badań na oczyszczalni ścieków typu Lemna w Boronowie mierzono temperaturę ścieków w poszczególnych punktach poboru oraz przeprowadzono analizy mikrobiologiczne. Temperatura ścieków surowych wahała się od 11-16°C, ścieków napowietrzanych od 13- 20°C, ścieków w komorze nityfikacyjnej od 13-18°C (Tab.1).

**Tabela 1.** Temperatura ścieków i powietrza

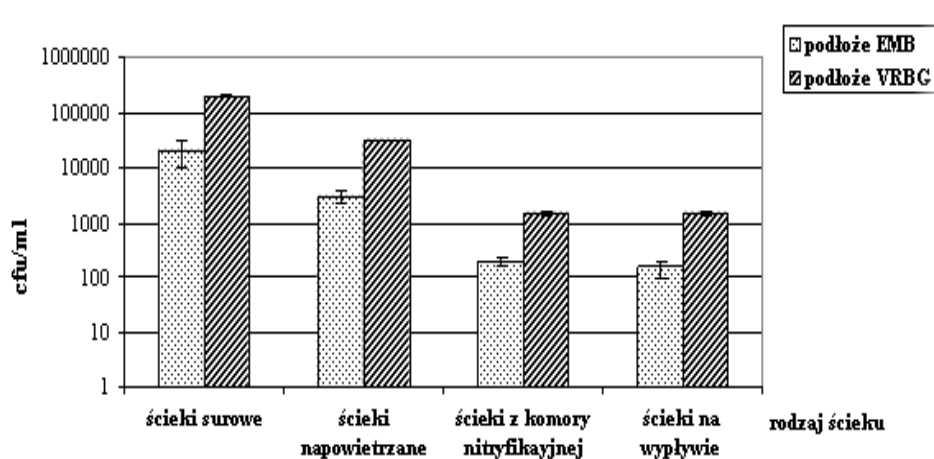
Rodzaj ścieku	Data poboru			
	4.IV.2005	18.IV.2005	25.IV.2005	23.V.2005
	Temperatura powietrza			
	+18°C	+11°C	+12°C	+19°C
Temperatura ścieków				
Ścieki surowe	+15°C	+13°C	+11°C	+16°C
Ścieki napowietrzane	+15°C	+15°C	+13°C	+20°C
Ścieki z komory nityfikacyjnej	+14°C	+15°C	+13°C	+18°C
Ścieki na wyptywie	+11°C	+12°C	+11°C	+15°C

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotne różnice ilości badanych bakterii w ściekach surowych od 20 tys. – 3,75 mln x ml<sup>-1</sup> (Rysunki 1-4). Różnice te związane są z nierytmiczną dostawą ścieków, ponieważ ścieki dowożone są również beczkowozami [3,4].

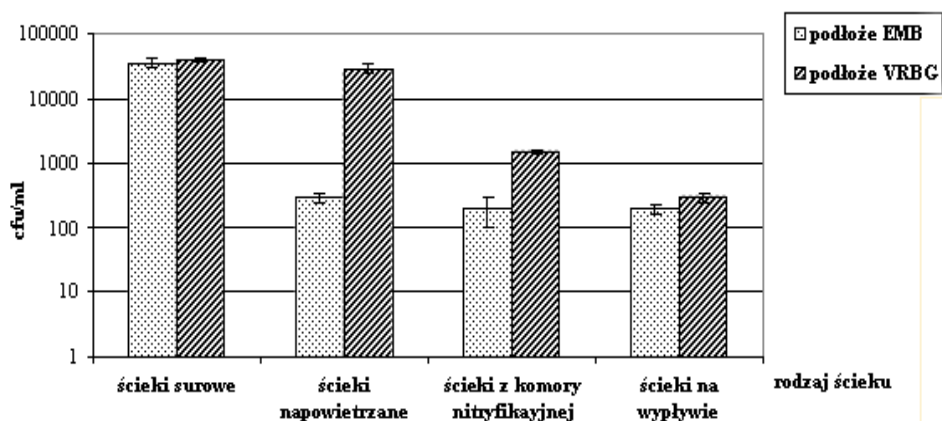
We wszystkich seriach liczebność pałeczek jelitowych bakterii ulegała znacznemu zmniejszeniu, co wskazuje na fakt, że jednorazowe zrzuty ścieków nawet o bardzo wysokich ładunkach zanieczyszczeń nie wpływają znacząco na końcowy wynik oczyszczenia w oczyszczalniach typu Lemna [2]. Szczególnie dużą redukcję obserwowano w stawie napowietrzanym. Jest to prawdopodobnie związane z zatrzymaniem ścieków w stawie, ponieważ w

systemie Lemna w Boronowie ok. 50% „czasu zatrzymania ścieków” jest w stawie napowietrzonym [2].

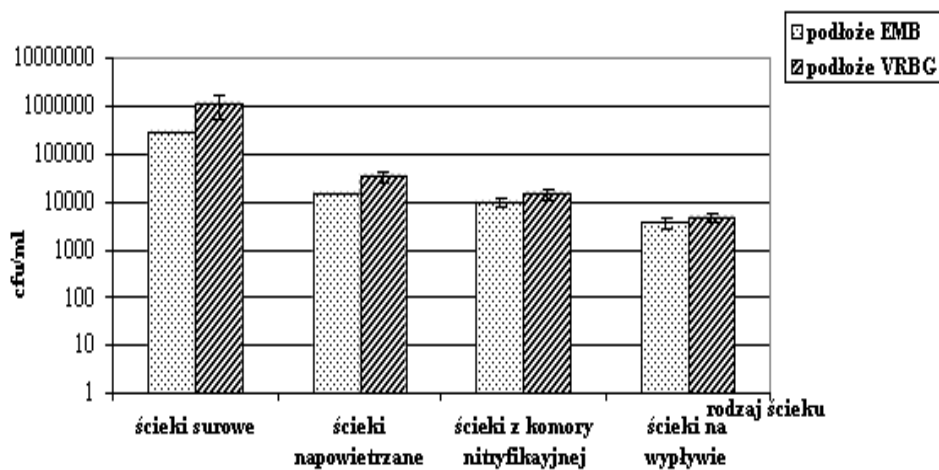
W ściekach na wypływie obserwowano obniżenie liczebności pałeczek jelitowych o ok. 2 - 3 rzędy wielkości (Rysunki 1-4). Podobne zmniejszanie wszystkich wskaźników o 2 – 4 rzędy wielkości obserwowano w oczyszczalniach hydrobotanicznych Kefalla [13]; zbliżone jest to do redukcji liczebności pałeczek jelitowych w konwencjonalnych oczyszczalniach [8,9].



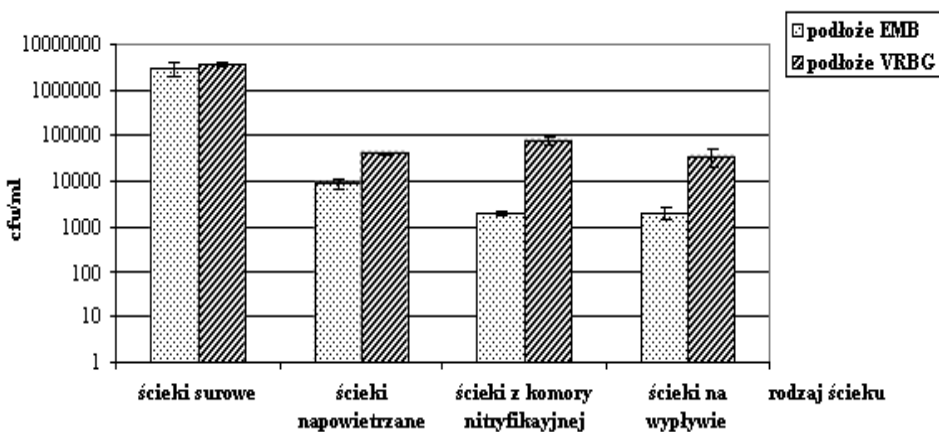
Rysunek 1. Liczebność bakterii w ściekach w dniu 06.04.2005



Rysunek 2. Liczebność bakterii w ściekach w dniu 19.04.2005



Rysunek 3. Liczebność bakterii w ściekach w dniu 27.04.2005



Rysunek 4. Liczebność bakterii w ściekach w dniu 24.05.2005

Redukcja liczebności pałeczek jelitowych w porównaniu ze ściekami surowymi wynosiła od 98 – 99,8% (Tabela 2), podobnie jak redukcja uzyskiwana na oczyszczalniach biologicznych [8,9], różni się natomiast od wyników podawanych przez Thurstona i in (cyt za 1), gdzie redukcja bakterii coli fekalnych w stawie Lemna wynosiła 59%.

**Tabela 2.** Stopień redukcji liczebności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w 1cm<sup>3</sup> biościeków

Data	% redukcji bakterii na wyptywie określany na podłożu EMB	% redukcji bakterii na wyptywie określany na podłożu VRBG
6.04.2005	99,2%	99,2%
19.04.2005	99,4%	99,0%
27.04.2005	98,7%	99,4%
24.05.2005	99,8%	99,0%

Z kolei w badaniach Decampa redukcja liczebności bakterii była rzędu 67% [14]. Decamp zwraca też uwagę na dużą ilość uszkodzonych komórek bakteryjnych w ściekach, których liczba waha się od 45 - 78% ogólnej liczby. Komórki takie zwykle nie są zdolne do wzrostu na standardowych podłożach [7]. Karim i in [15], w badaniach nad przeżywalnością bakterii coli fekalnych w stawie z rzęsą stwierdzili ubytek rzędu 57,15%, a pałeczek *Salmonella typhimurium* 61,9% po 14 dniach. Można przypuszczać, że po wydłużeniu czasu badań, redukcja ilości tych bakterii byłaby wyższa. W oczyszczalni w Boronowie „czas zatrzymania ścieków” sięga 60 dni [3,4], stąd prawdopodobnie obserwowano wyższą redukcję bakterii.

Zbliżone wyniki do wartości otrzymanych w Boronowie (Tab.3) otrzymali w badaniach Keffala i Ghrabi [13], którzy stwierdzili redukcję liczebności wskaźników ( coli fekalne i *E.coli* ) rzędu 90%, w czasie oczyszczania ścieków oczyszczalniach hydrobotanicznych.

**Tabela 3.** Najbardziej Prawdopodobna Liczba (NPL) bakterii coli termotolerancyjnych w 100 cm<sup>3</sup> próbki

Data	Ścieki surowe	Ścieki z na odpływie
6.04. 2005	2 300 000	24 000
19.04.2005	2 400 000	24 000
27.04.2005	2 400 000	24 000
24.05.2005	240 000 000	2 400

Obserwowana tak duża redukcja ilości pałeczek jelitowych szczególnie w maju, może być wynikiem zarówno wykształcenia się odpowiedniego zespołu bakteriożerców [7], jak i zwiększonej aktywności zooplanktonu przy temperaturze powyżej 18 °C [17]. Wodny zooplankton szczególnie aktywnie „wyżera” gram ujemne pałeczki, z uwagi na strukturę ich ściany komórkowej [7], a wyższa temperatura stymuluje rozwój i aktywność pierwotniaków [17].

Podobnie Decamp [14] uważa, że głównym czynnikiem eliminującym ze ścieków bakterie przewodu pokarmowego jest ich wyżeranie przez zoofaunę.

Na obniżenie liczebności badanych bakterii ma wpływ również długie zatrzymanie ścieków w stawie, podczas którego bakterie mogą ulegać sedymentacji i przechodzić do osadów [15] lub też ulegać adsorpcji na cząstkach organicznych [16]. Nie wykluczony jest też wpływ obecności odpowiednich bakteriofagów [7].

Zbliżone wyniki redukcji ilości bakterii otrzymali Keffal i Ghrabi [13], którzy ponadto stwierdzili brak wpływu testowanych roślin na tę redukcję, ponieważ usuwanie bakterii ze ścieków było takie samo w obecności roślin (*Phragmites* i *Typha*) jak i bez nich [13].

W oczyszczalni typu Lemna części naziemne roślin kontaktują się z atmosferą, która stanowi źródło dwutlenku węgla, a bezpośrednio z wody stawu czerpią pierwiastki biogenne [18], rzęsa może więc, podobnie jak trzcina i pałka nie odgrywać żadnej roli w eliminacji bakterii. Natomiast na jej wzrost duży wpływ ma temperatura powietrza i ścieków [18]. Podobnie Stottmeister i in. uważają, że w oczyszczalniach hydrobotanicznych główną rolę w transformacji i mineralizacji substancji organicznej i zanieczyszczeń w ściekach odgrywają mikroorganizmy, a nie rośliny [1].

Porównując zastosowane w badaniach podłoża zaobserwowano, że liczebność potencjalnych pałeczek jelitowych w większości prób była wyższa na podłożu VRBG, z czerwienią obojętną i fioletem krystalicznym, niż na podłożu EMB, z eozyną i błękitem metylenowym (Rysunki 1-4). Podłoże VRBG zalecane jest przez normę PN-A-04023 [12] do wykrywania pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* w żywności, uzyskane wyniki wskazują więc na przydatność pożywki VRBG i możliwość stosowania jej do izolacji pałeczek jelitowych, również ze ścieków.

Przynależność rodzajową pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* określano w czwartej serii badań, wszystkie wyrosłe kolonie bakterii izolowano, oczyszczano i poddano standardowym, biochemicznym testom identyfikującym oraz zastosowano testy API (Biomerieux) [10, 12, 19]. Wyizolowane szczepy należały do gramujemnych pałeczek, oksydazujemnych, w większości ruchliwych z rodziny *Enterobacteriaceae* [12,19] (Tabela 4).



**Tabela 4.** Procentowy udział dominujących bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w ściekach w oczyszczalni w Boronowie

a) Ścieki surowe	b) Komora napowietrzania	c) Komora nityfikacyjna	d) odpływ
<i>Enterobacter</i> 14%	<i>Escherichia</i> 20%	<i>Proteus</i> - <i>Providencia</i> 80%	<i>Enterobacter</i> 25%
<i>Escherichia</i> 28%	<i>Klebsiella</i> 60%	<i>Yersinia</i> 20%	<i>Escherichia</i> 50%
<i>Klebsiella</i> 14%	<i>Serratia</i> 20%		<i>Yersinia</i> 25%
<i>Proteus</i> - <i>Providencia</i> 28%			
<i>Yersinia</i> 14%			

Jakość i stan sanitarny ścieków zależy od ilości mieszkańców zlewni i stanu ich zdrowia [5]. W badanych ściekach surowych stwierdzono że dominujące bakterie należały do 6 różnych rodzajów, jak: *Enterobacter*, *Echerichia*, *Klebsiella*, *Proteus-Providencia*, *Serratia* i *Yersinia*. Są to typowe bakterie występujące w przewodzie pokarmowym człowieka [6,7,10]. Podczas oczyszczania ścieków zmieniał się skład rodzajowy populacji, ilość rodzajów ulegała zmniejszeniu i na odpływie wystąpiły 3 rodzaje bakterii: *Escherichia*, *Enterobacter* i *Yersinia*. Podobne wyniki obserwowano w konwencjonalnej oczyszczalni ścieków [8].

#### 4. Podsumowanie

W badaniach mikrobiologicznych ścieków w oczyszczalni hydrobotanicznej typu Lemna w Boronowie określano obecność gram ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* zarówno w ściekach surowych jak i podczas procesu oczyszczania ścieków. Wyizolowane bakterie poddano testom morfologicznym i biochemicznym wg normy PN-A-04023. 2001, oraz użyto testów firmy Microgen Bioprodukts: Microgen™ GN-ID Identification, oraz API (Biomerieux). Oczyszczanie ograniczyło liczebność bakterii na wypływie o ok. 99%, a także wyeliminowało występowanie niektórych rodzajów spośród *Enterobacteriaceae*.

Przeprowadzone badania wskazują, że właściwa praca oczyszczalni hydrobotanicznej, z długim okresem zatrzymania ścieków, pozwala na znaczne usuwanie potencjalnych bakterii chorobotwórczych ze ścieków, a jednorazowe zrzuć ścieków nie wpływają znacząco na końcowy wynik oczyszczenia w oczyszczalniach typu Lemna, przy odpowiedniej temperaturze i czasie zatrzymania, Jednak ze względu na dużą zawartość bakterii w ściekach doptywających, do wód powierzchniowych nadal odprowadzane są znaczne ilości drobnoustrojów.

## Literatura

1. Stottmeister U., A. Wießner, P.Kusch, U. Kappelmeyer, M. Kästner, O.Bederski, R.A.Müller, H.Moormann. 2003. *Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. Biotechnology Advances*, **22**, 93-117
2. Białończyk J.. *Hydrobotaniczne oczyszczalnie ścieków typu Lemna*. Wiadomości melioracyjne i łąkarskie. Zagadnienia inżynierii środowiska wiejskiego. 2003. **3**, 132 – 136. Wydawnictwo BIGRAF, Warszawa.
3. Terebiński D., M.Polit M. *Instrukcja Obsługi i Eksploatacji Oczyszczalni Ścieków „Lemna” w Boronowie*. Materiały gminne. Sierpień, 1999. Kielce
4. Umińska K.. *Operat wodno-prawny na odprowadzenie oczyszczonych ścieków do rzeki Liswarty oraz eksploatację oczyszczalni komunalnej Lemna w Boronowie*. Materiały gminne, listopad, 1999
5. George I., P.Crop, P.Servai. *Faecal removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods*. Water Res. 2002, **36**, 2601-2617
6. Libudzisz Z., K.Kowal. *Mikrobiologia techniczna*. Politechnika Łódzka, Łódź, 2000
7. Smyła A. *Zagrożenia bakteryjne wód powierzchniowych*. 2005. VII Ogólnopolska Sesja Popularnonaukowa „Środowisko a Zdrowie – 2005”. Jasna Góra – Częstochowa
8. Smyła A., K. Karpińska, M. Bawor. *Zmiany liczebności bakterii mezofilnych w trakcie oczyszczania ścieków*. 2003. Prace Naukowe WSP Częstochowa. Seria: Chemia i Ochrona Środowiska, **VII**, 159 – 170
9. Szumilas T., M. Michalska, M. Bartoszewicz. *Charakterystyka bakteryjnego zanieczyszczenia ścieków komunalnych z dużej aglomeracji miejskiej i ocena stopnia redukcji tego zanieczyszczenia w procesie biologicznego oczyszczania ścieków*. Roczn. PZH. 2001, **52/2**, 155-165
10. Burbianka M., A. Pliszka.: *Mikrobiologia żywności*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa. 1997.
11. PN – R – 64792. *Pasze. Oznaczanie liczby bakterii z rodzaju Enterobacteriaceae. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL) i metoda liczenia kolonii*. Grudzień, 1997.
12. PN–A–04023. *Mikrobiologia żywności. Wykrywanie i identyfikacja drobnoustrojów z rodziny Enterobacteriaceae*. Grudzień, 2001.
13. Keffala C., A.Ghrabi. *Nitrogen and bacterial removal in constructed wetlands treating domestic waste water*. 2005. *Desalination*, **185**, 383-389
14. Decamp O., A.Warren. *Abundance, biomass and viability of bacteria in wastewaters: impact of treatment in horizontal subsurface flow constructed wetlands*. *Water Res.*, 2002, **35**, 3496-3501
15. Karim M.R., F.D.Manshadi, M.M. Karpiscak, C.P.Gerba. *The persistence and removal of enteric pathogens in constructed wetlands*. *Water Res.*, 2004, **38**, 1831-1837
16. Ottona V., J. Balcarova, J.Vymazal. *Microbial characteristics of constructed wetlands*. *Water Sci. Tech.*, 1997, **35/5**, 117-123

- 
17. Koton-Czarnecka M., R. Chróst. Konsumpcja bakterii przez pierwotniaki w ekosystemach wodnych. *Post. Mikrobiol.*, 2001, **40**, 219-240
  18. van der Heine T., R. M.M.Roijackers, E.H.van Nes, E. T.H.M.Peters. *A simple equation for describing the temperature dependent growth of free-floating macrophytes. Aquatic Botany*, 2006, **84**, 171-175
  19. Szewczyk E.M., Diagnostyka bakteriologiczna. Wyd. Nauk. PWN Warszawa 2005
- 

Beata Bobek  
Joanna Kandzia  
Aleksandra Smyłła

### ***Enterobacteriaceae* in the sewage from the wetlands Lemna pond system**

**Abstract:** The sewage microbiological investigation was carried out in four series during April and May of 2005 at the Constructed Wetlands Lemna Pond System of Boronów town. The samples represented the following types of the sewage: 1) influent wastewater, 2) wastewater from the aerated pond, 3) wastewater from the nitrification pond and 4) effluent from the outflow point. The number of *Enterobacteriaceae* was estimated using EMB (eosine methylene blue) and VRBG (crystal violet, neutral red, bile and glucose) media; the dominating microbial colonies were isolated and identified to the species level by use of the standard biochemical tests. In the four series of the influent wastewater, it was noticed that there was a significant difference in the number of *Enterobacteriaceae*, ranging from 100 000 to 4 300 000/cm<sup>3</sup>, because of the irregular supply of waste water. In all series, the number of bacteria has been largely reduced in each step of purification, in particular a large reduction was observed in the aerated pond.

**Keywords:** bacteria, purification, sewage