

ZASTOSOWANIE SUROWYCH ŚCIEKÓW MLECZARSKICH JAKO POŻYWKI DO HODOWLI MIKROALG *CHLORELLA SP.*

Karolina Dziosa¹, Monika Makowska¹

¹ Instytut Technologii Eksploatacji – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Pułaskiego 6/10, 26-600 Radom, e-mail: karolina.dziosa@itee.radom.pl, monika.makowska@itee.radom.pl

STRESZCZENIE

Celem prowadzonych badań było określenie możliwości zastosowania surowych ścieków mleczarskich jako pożywki do hodowli alg *Chlorella sp.* Badania zostały przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych. Podłoże hodowlane stanowiły surowe ścieki mleczarskie zaszczepione innokulum glonowym. Na starcie i zakończeniu hodowli wykonano oznaczenia spektrofotometryczne substancji biogenych azotu ogólnego, fosforu ogólnego oraz azotu amonowego. Przyrost biomasy mikroalg oceniano na podstawie codziennego pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 686 nm. Przeprowadzone badania potwierdziły możliwość zastosowania ścieków mleczarskich jako pożywki do hodowli mikroalg. Od momentu rozpoczęcia hodowli do jej zakończenia uzyskano ok. 70% spadek całkowitej zawartości azotu ogólnego, ok. 92% spadek zawartości azotu amonowego oraz 55% spadek zawartości fosforu ogólnego w podłożu hodowlanym.

Słowa kluczowe: algi, *Chlorella sp.*, ścieki mleczarskie, przemysł spożywczy, gęstość optyczna, substancje biogenne

THE USE OF DAIRY WASTEWATER AS A MEDIUM FOR *CHLORELLA SP.*

ABSTRACT

The aim of the research was to determine the possibility of using raw dairy wastewater as a medium for algae cultivating. The experiments were carried out under the laboratory conditions. The culture medium was raw dairy wastewater vaccinated with algae cells. At the beginning and the end of the culture, the signs of biogenic substances of general nitrogen, total phosphorus and ammonium nitrogen were made. Microalgal biomass growth was assessed on a daily basis, at the optical density of 686 nm. The research results have confirmed the possibility of using dairy wastewater as a microalgal culture medium. From the beginning of cultivation until its completion, the total contents of nitrogen, ammonia nitrogen and total phosphorus were reduced by 70%, 92% and 55%, respectively.

Keywords: microalgae, *Chlorella sp.*, dairy wastewater, optical density, nutrients

WSTĘP

W ostatnich latach problem ochrony środowiska naturalnego stał się jednym z najważniejszych priorytetów polityki międzynarodowej, szczególnie wśród krajów rozwiniętych. Problem postępującej degradacji środowiska spowodowany jest przede wszystkim dużymi ilościami odpadów zarówno komunalnych, jak i przemysłowych [1]. Zwykle są one bardzo trudne do utylizacji lub zagospodarowania, nie wspominając o możliwości ekonomicznego ich wykorzystania. Odprowadzanie odpadów do kanalizacji pociąga za sobą ryzyko nałożenia na zakład wysokich kar pieniężnych, a większość sposobów utylizacji i składowania

jest kosztowna i nieopłacalna [1, 2]. W przedsiębiorstwach problemy ochrony środowiska związane są głównie z gospodarką wodno-ściekową [3]. W tym aspekcie wielokrotne wykorzystanie wody w zamkniętym obiegu technologicznym staje się ważne nie tylko ze względu na unormowania prawne, korzyści ekonomiczne, ale także wpływa na konkurencyjność przedsiębiorstwa na rynkach krajowych oraz międzynarodowych [2, 3]. Obowiązujące przepisy unijne i krajowe, wymuszają na przedsiębiorstwach zajmujących się przetwórstwem żywności szereg zmian. Zmiany te dotyczą standardów jakości dla żywności oraz ochrony środowiska. Przedsiębiorcy zostali zobligowani do przestrzegania ustaw i aktów

prawnych (Ustawa z dnia 18 lipca 2001 r. Prawo wodne, ustawa z dnia 14 grudnia 2012 r. O odpadach), które zastrzegają przepisy gospodarki wodno-ściekowej [4].

Jednym z najszybciej rozwijających się działów gospodarki w Polsce jest przemysł spożywczy. Przedsiębiorstwa przemysłu spożywczego ze swoją specyfiką stanowią źródło wielu zagrożeń dla wszystkich elementów środowiska naturalnego (gleby, wody, powietrza, roślin, zwierząt oraz człowieka). W branżach przemysłu spożywczego wykorzystuje się wodę technologiczną, techniczną oraz wtórną. Woda technologiczna i wtórna pozostaje w bezpośrednim kontakcie z żywnością i nie może zawierać zanieczyszczeń stwarzających ryzyko dla zdrowia lub życia człowieka [4, 5]. Woda stosowana w przemyśle spożywczym powinna odpowiadać standardom wody pitnej a jej parametry są kontrolowane przez Państwową Inspekcję Sanitarną (kontrola zewnętrzna) oraz dostawcę wody (kontrola wewnętrzna). Woda wtórna stosowana w produkcji musi być rozprowadzana oddzielnym systemem rurociągów, nigdy nie może wejść w kontakt z produktem dopóki nie zostanie wysterylizowana [5].

Największą branżą przemysłu spożywczego w Polsce, ze względu na zużycie wody oraz produkcję surowca jest przemysł mleczarski. Wodę w przemyśle mleczarskim wykorzystuje się w celach energetycznych, technologicznych oraz gospodarczo-higienicznych. Średnia mleczarnia w Polsce odprowadza około 450–600 m³/ścieków/d [3, 5]. Ścieki przemysłu mleczarskiego można podzielić na trzy grupy wody procesowe (używane w procesach produkcyjnych, chłodzenia i ogrzewania), wody przemysłowe (pochodzą z czyszczenia urządzeń mających kontakt mlekiem lub przetworami mlecznymi), ścieki sanitarne [3, 4].

Wykorzystanie odpowiednio skonfigurowanego zestawu technik membranowych daje możliwość frakcjonowania mieszanin ścieków poprzemysłowych na grupy o zgrubnie zdefiniowanym składzie, ułatwiając tym samym ich dalsze wykorzystanie lub utylizację [6]. Oddzielenie substancji organicznych o wysokiej masie cząsteczkowej (tłuszczów, białek, wielocukrów) od substancji mineralnych ma potencjał powtórnego wykorzystania tych związków jako składników hodowlanych podłoży fermentacyjnych do wytwarzania użytecznych produktów biotechnologicznych (fermentacja alkoholowa, octowa, metanowa, produkcja enzymów itp.) [6]. Ścieki z przemysłu mleczarskiego charakteryzują się

wysoką zawartością substancji biogenych (azot i fosfor), które są niezbędnych do życia dla mikroorganizmów [4, 6]. Dlatego też jednym z rozwiązań zagospodarowania ścieków i odpadów powstających w mleczarni wydaje się wykorzystanie generowanych strumieni odpadowych w procesie hodowli mikroalg [7]. Jako organizmy autotroficzne pełnią funkcję pierwotnego producenta materii organicznej w zbiornikach wodnych. Ze względu na wysoką zdolność adaptacji do zmiennych warunków środowiska i warunków hodowli najbardziej interesującymi spośród mikroalg są glony słodkowodne z rodzaju zielenic – *Chlorella sp.* [8, 9]. Odpowiednie stymulowanie procesami technologicznymi w zakresie hodowli *Chlorelli sp.* wpływa bezpośrednio na możliwość uzyskania produktów końcowych o określonych właściwościach i o określonym składzie metabolitów. Wiele szczepów mikroalg z gatunku zielenic posiada zdolności do akumulacji lipidów w komórkach w ilości od 20% do 50% suchej masy oraz syntezy białek, których koncentracja w komórce glonów wynosi od 20% do 60% [10, 11, 12]. Algi mogą być również zastosowane do oczyszczania ścieków, w celu odzysku wody i powtórnego jej wykorzystania do celów produkcyjnych [4, 12].

Celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania surowych ścieków mleczarskich jako pożywki do hodowli alg *Chlorella sp.*

METODYKA BADAŃ

Hodowla została zaszczerpiona przez glony z gromady zielenic *Chlorella sp.* Laboratoryjne hodowle mikroalg prowadzono w szklanych kolbach miarowych o pojemności 1 dm³. (objętość czynna hodowli 700 ml) przez 16 dni. Wymiana gazowa pomiędzy otoczeniem a cieczą hodowlaną była zapewniona poprzez zastosowanie korków celulozowych. Hodowla była prowadzona z wykorzystaniem wytrząsarki laboratoryjnej IKA KSS260 control, prędkość 140 rpm. Naczynia hodowlane doświetlano w ciągu doby za pomocą lampy LED Neonica Growy LED 118, dedykowanej do intensywnej uprawy roślin. Hodowla prowadzona była w stałych warunkach temperaturowych 25±1°C.

Jako podłoże hodowlane zastosowano ścieki pochodzące z mycia linii technologicznej pozyskane z zakładu mleczarskiego, których charakterystyka została przedstawiona w tabeli 1.

Efektywność przyrostu biomasy mikroalg *Chlorella sp.* w podłożu hodowlanym oceniano

Tabela.1. Właściwości fizyko-chemiczne ścieków mleczarskich**Table 1.** Physicochemical properties of dairy wastewater

| Parametr | Wartość |
|---------------------|---------|
| pH | 10,77 |
| Azot ogólny [mg/l] | 105 |
| Azot amonowy [mg/l] | 3,88 |
| Fosfor [mg/l] | 20,2 |
| Przewodność [mS/cm] | 2,81 |
| Mętność [NTU] | 2152 |
| Wapń [mg/l] | 8,26 |
| Chlorki [mg/l] | 478 |
| Potas [mg/l] | 229 |
| Sód [mg/l] | 3467 |
| Azotany [mg/l] | 49,7 |

na podstawie pomiaru gęstości optycznej (OD). Próbkę o objętości 2,5 cm³ umieszczano w jednorazowych kuwetach spektrofotometrycznych i mierzono absorpcję promieniowania w zakresie widzialnym. Jako ciecz odniesienia stosowano wodę destylowaną. Do badań wykorzystano spektrofotometr UV-VIS Hach DR 6000. Optymalną długość fali dla chlorofilu określano na podstawie przeglądowego widma UV-VIS i wynosiła 686 nm (rysunek 1).

Próbki pobrane z naczynia hodowlanego filtrowano za pomocą sączka bibułowego MN 619 (φ 150 mm, grubość 0,17 mm, gramatura 75 g/mm²) do uzyskania klarownego, bezbarwnego roztworu. W przesączu określano zawartość substancji biogenych (azotu amonowego, azotu całkowitego oraz fosforu całkowitego) przy zastosowaniu testów kuwetowych Hach Lange, zgodnie z obowiązującymi normami (tabela 2). Wybór

długości fali dokonywany był automatycznie w zakresie 190÷1100 nm (dokładność ±1 nm, rozdzielczość ±0,1 nm). Oznaczenia prowadzono pierwszego i ostatniego dnia hodowli.

Oceny fitoplanktonu dokonywano przy wykorzystaniu mikroskopu biologicznego MK 358 Opta-Tech, wyposażonego w kamerę cyfrową OPTA-TECH 3MP, obiektywy semi-plan (40x).

Pomiary pH i przewodności przeprowadzono za pomocą multimiernika Mettler Toledo Seven Multi. Stężenia jonów wapnia, chlorków, potasu sodu i azotanów wyznaczano za pomocą elektrod jonoselektywnych Mettler Toledo. Pomiar zmętnienia przeprowadzono z wykorzystaniem przenośnego miernika HACH 2100Q IS.

WYNIKI I DYKUSJA

Inokulum zaszczipiające hodowle pochodziło z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich (Uniwersytet Gdański, Instytut Oceanografii w Gdyni). Do kolby miarowej w której prowadzono eksperyment, wprowadzono 20 cm³ inokulum zaszczipiającego. Na rysunku 2 przedstawiono mikroskopowy obraz komórek alg zarejestrowany pierwszego i ostatniego dnia hodowli.

Przebieg wzrostu biomasy mikroalg w hodowli prowadzonej w sposób okresowy opisywany jest jako przyrost liczby komórek w jednostce objętości pożywki. Efektywność namnażania alg w czasie prowadzenia eksperymentu dokonano na podstawie pomiaru gęstości optycznej OD₆₈₆. Wartość początkowa OD₆₈₆ została oznaczona po upływie 1h po zainicjowaniu hodowli mikroalg (rysunek 3).

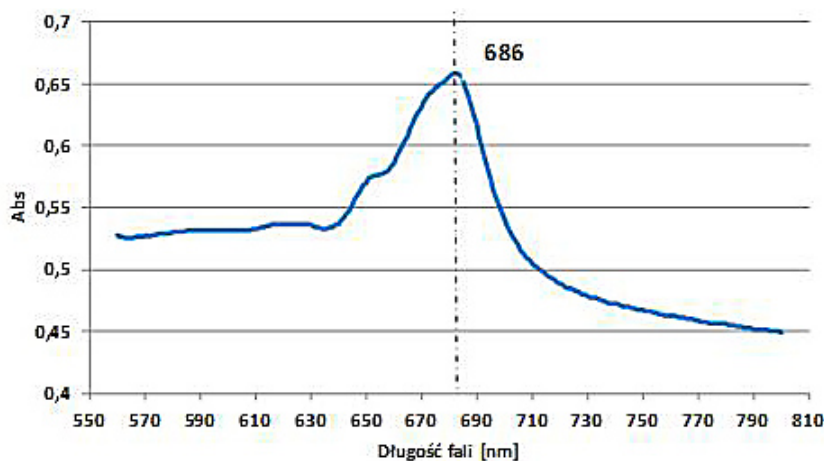
**Rys. 1.** Widmo przeglądowe UV-VIS dla chlorofilu**Fig. 1.** UV-VIS spectra for chlorophyll

Tabela 2. Wykaz parametrów fizyko-chemicznych oznaczanych w hodowli
Table 2. Physicochemical parameters determined in the culture

| Lp. | Oznaczany parametr | Zakres pomiarowy [mg/dm ³] | Metoda/norma | Długość fali [nm] |
|-----|--------------------|--|------------------------------|-------------------|
| 1. | Azot amonowy | 0,015±2,0 | ISO 7150-1 DIN 38406 E5-1 | 694 |
| | | 1±12 | | |
| 2. | Azot ogólny | 20±100 | EN-ISO 11905-1 | 345 |
| 3. | Fosfor ogólny | 2±20 | EN ISO 6878-1 DIN 38405 | 880 |

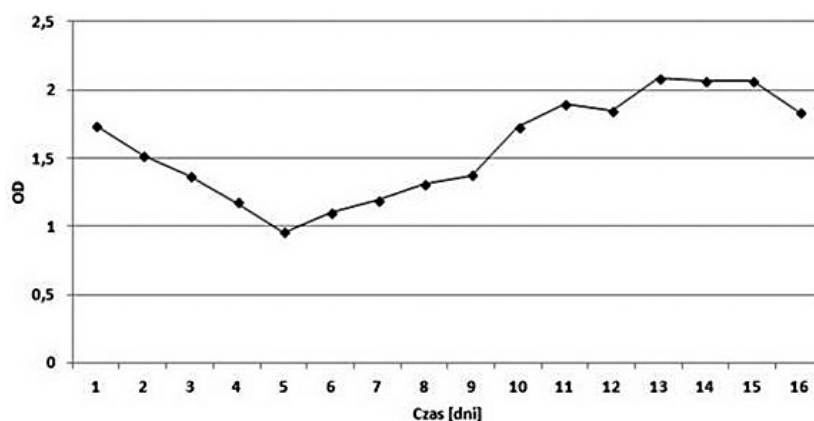
a)



b)



Rys. 2. Zdjęcia mikroskopowe mikroalg *Chlorella sp.* a) pierwszego dnia hodowli, b) ostatniego dnia hodowli
Fig. 2. Microscopic images of *Chlorella sp.* microalgae a) the first day of cultivating b) the last day of cultivating.



Rys. 3. Przyrost biomasy mikroalg na podstawie pomiaru gęstości optycznej (OD)

Fig. 3. Biomass growth of microalgae based on the optical density measurement

Na podstawie danych przedstawionych na rysunku 3, stwierdzono że w początkowym okresie hodowli (1–5 dnia) następowała adaptacja komórek mikroalg do nowych warunków środowiska. W tym czasie wartość gęstości optycznej spadła z 1,735 do 0,974. Po upływie tego czasu hodowla przeszła w fazę intensywnego wzrostu, trwającą do 13 dni. W tym czasie nastąpiło przyspieszenie procesów metabolicznych co wiązało się z największym przyrostem biomasy w czasie trwania całej hodowli (z 0,955 – 2,089). W kolejnym etapie nastąpiło spowolnienie i stabilizacja przyrostu

biomasy mikroalg, hodowla przeszła w fazę stabilizacji, charakteryzującą się stałą liczbą żywych komórek w hodowli. Eksperyment został zakończony 16 dnia aby nie dopuścić do faz zamierania, w której pogarszają się warunki tlenowe hodowli oraz dochodzi do obumierania komórek mikroalg. Końcowa wartość gęstości optycznej wynosiła 2,09 i była porównywalna z wartościami uzyskiwanymi w przypadku stosowania pożywki syntetycznej do zasilania hodowli alg.

Szybkość przyrostu biomasy mikroalg *Chlorella sp.* hodowanych w warunkach laborato-

ryjnych jest zależna od obecności w podłożu hodowlanym, substancji biogennych takich jak azot amonowy, azot ogólny oraz fosfor ogólny. Dostarczenie składników odżywczych do podłoża powinno odbywać się w sposób kontrolowany, tak aby mikroorganizmy miały dostęp do optymalnej ilości pokarmu. Wartości końcowe parametrów, oznaczonych ostatniego dnia hodowli zostały przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3. Końcowe właściwości fizyko-chemiczne hodowli mikroalg

Table 3. The Final physicochemical properties of microalgae cultures

| Parametr | Wartość końcowa |
|---------------------|-----------------|
| pH | 8,77 |
| Azot ogólny [mg/l] | 31,0 |
| Azot amonowy [mg/l] | 0,309 |
| Fosfor [mg/l] | 8,89 |

Zawartość azotu amonowego prowadzonej hodowli została ograniczona o 92% z poziomu wyjściowego 3,8 mg/l do wartości 0,309 mg/l. Przystawalność azotu amonowego jako składnika biogennego związana jest z procesami rozwojowymi glonów. Im większa liczba komórek alg w hodowli, tym większe zapotrzebowanie na składniki pokarmowe. Zawartość azotu ogólnego została zredukowana o 70% (105 mg/l do 31,0 mg/l). Natomiast zawartość fosforu ogólnego, jako pierwiastka limitującego wzrost alg, została zredukowana o 55% (z 20,2 do 8,89 mg/l). Równocześnie odnotowano spadek pH z 10,77 do 8,77. Przedstawione zależności świadczą o możliwości zaspokojenia podstawowych zapotrzebowań pokarmowych mikroalg, poprzez zastosowanie surowych ścieków mleczarskich bogatych w substancje biogenne jako pożywki hodowlanej. Dalsze badania będą prowadzone w kierunku oczyszczanie ścieków mleczarskich i odzysku wody, która może zostać powtórnie wykorzystana do celów produkcyjnych w zakładzie przemysłowym.

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania potwierdziły, że możliwa jest hodowla mikroglonów *Chlorella sp.* z zastosowaniem surowych ścieków mleczarskich jako podłoża hodowlanego. Kontrola wartości OD_{686} , prowadzona równolegle z oznaczaniem zawartości azotu i fosforu w podłożu hodowlanym, umożliwi ocenę przebiegu procesów

metabolicznych zachodzących w komórkach mikroalg. W czasie trwania eksperymentu uzyskano przyrost biomasy wynoszący po 16 dniach 2,09. W tym samym czasie uzyskano redukcję substancji biogennych azoty ogólnego o 70%, azotu amonowego o 92% a fosforu ogólnego o 55%.

LITERATURA

1. Kasztelan A. 2012. Oddziaływanie przemysłu spożywczego na środowisko naturalne. *Przemysł Spożywczy*, 10, 60–68.
2. Quin J. 2015. Bio-hydrocarbons from algae – impacts of temperature, light and salinity on algae growth. Barton, Australia: Rual Industries Research and Development Corporation.
3. Steinhof-Wrzeźniewska A., Rajmund A., Godzwon J. 2013. Zużycie wody w wybranych branżach przemysłu spożywczego. *Inżynieria Ekologiczna*, 32, 164–171.
4. Deja A.:2001. Zadania przemysłu spożywczego z zakresu ochrony środowiska świetle przepisów polskich i UE, *Przemysł Spożywczy*, 54–56.
5. Kasztelan A., Kierepka M. 2014. Impact of the food industry on the environment in Poland. *Polish Association of Agricultural and Agribusiness Economists. Scientific Yearbooks* 16 (2), 109–116.
6. Belotti G., Caprariis B., Filippis P., Scarsella M., Verdone N. 2014. Effect of *Chlorella vulgaris* growing conditions on bio-oil production via fast pyrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 61, 187–195.
7. Dębowski M., Zieliński M., Rokicka M., Kupczyk K. 2015. The possibility of Rusing macroalgae biomass from natural reservoirs as a substrate in the methane fermentation process. *International Journal Of Green Energy*, 12, 970–977.
8. Makowska M, Dziosa K. 2015. Wytwarzanie biomasy mikroalg w warunkach laboratoryjnych. *Przemysł Chemiczny*, 94/6, 982–985.
9. Kapdan I.K., Aslan S. 2014. Application of the Stover–Kincannon kinetic model to nitrogen removal by *Chlorella vulgaris* in a continuously operated immobilized photobioreactor system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83 (7), 998–1005.
10. Cheah W.Y, Ling T.Ch, Show P.L., Ching J.J. Chang J.S. Lee D.L. 2016. Cultivation in wastewaters for energy: A microalgae platform, *Applied Energy*, 179, 609–625.
11. Guo W.Q., Zheng H.S., Li S., Du J.S., Feng X.C., Yin R.L., Wu Q.L., Ren N.Q., Chang J.S. 2016., Removal of cephalosporin antibiotics 7-ACA from wastewater during the cultivation of lipid-accumulating microalgae. *Bioresource Technology*, 221, 284–290.
12. Dębowski M., Zieliński M., Rokicka M. 2016. Produkcja biomasy mikroglonów na bazie ścieków pochodzących z przemysłu mleczarskiego. *Inżynieria Ekologiczna*, 47, 54–59.