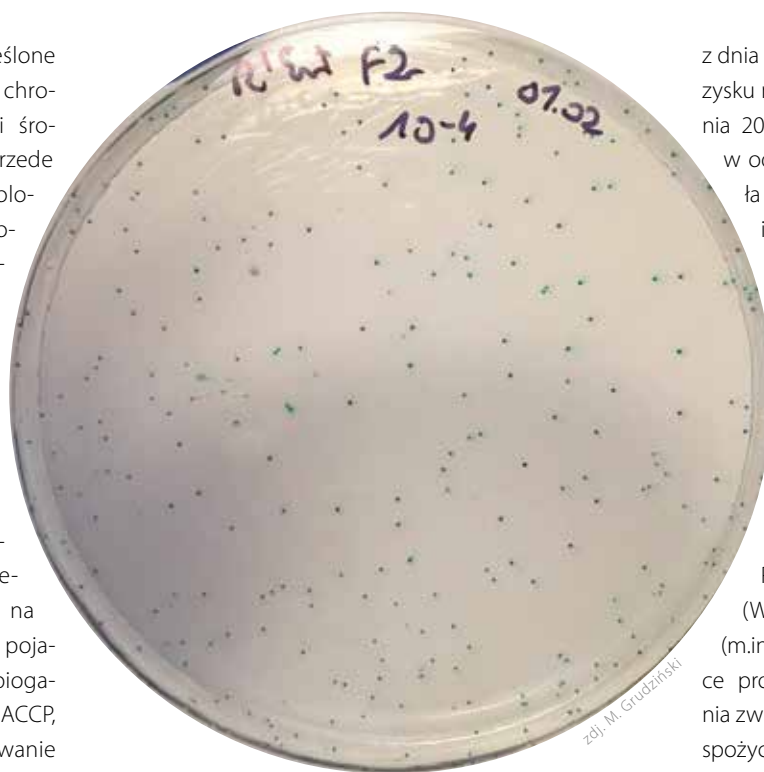


Mikrobiologia pofermentu

– badania, problemy, regulacje prawne

19.06.05 oraz 19.06.06 to kody odpadów przydzielone cieczom i prefermentowanym odpadom z beztlenowego rozkładu odpadów zwierzęcych i roślinnych, jakie powstają w każdej biogazowni w postaci tzw. pofermentu lub inaczej – pulpy pofermentacyjnej. Ustawa o odpadach w celu zagospodarowania pofermentu dopuszcza tzw. odzysk metodą R10, jednak aby tego dokonać, poferment musi najpierw spełniać wymagania określone w dwóch ustawach i związanych z nimi rozporządzeniach. Te same wymagania dotyczą pulpy pofermentacyjnej, której status ma się zmienić z odpadu na nawóz organiczny lub środek poprawiający właściwości gleby.

Wymagania określone w przepisach mają chronić nasze zdrowie i środowisko. Dotyczą przede wszystkim wskaźników mikrobiologicznych i biologicznych oraz dopuszczalnych zawartości metali ciężkich. Do produkcji biogazu coraz częściej są wykorzystywane odpady, które niosą ze sobą ryzyko wprowadzenia do fermentorów bakterii potencjalnie chorobotwórczych. Należą do nich przede wszystkim odpady pochodzenia zwierzęcego powstające podczas produkcji i przetwórstwa żywności. To dlatego na mocy Rozporządzenia 1069/2009 pojawił się obowiązek stosowania w biogazowniach elementów systemu HACCP, którego zadaniem jest wyeliminowanie ryzyka, że z biogazowni do środowiska przenikną mikroorganizmy szkodliwe dla zdrowia ludzi i zwierząt. Wiele doniesień naukowych (przykłady w spisie literatury) dostarcza dowodów, że prawidłowo przeprowadzony proces fermentacji metanowej, poprzedzony higienizacją lub sterylizacją odpadów odzwierzęcych, zapewnia znaczną redukcję liczebności bakterii potencjalnie chorobotwórczych lub wręcz całkowicie je eliminuje. Przy zachowaniu odpowiedniego reżimu technologicznego higienizacja nie zawsze jest potrzebna, bo sam proces fermentacji i warunki, w jakich zachodzi, spełniają



► Kolonie bakteryjne *Enterococcus spp.* na chromogennym podłożu agarowym

takie same funkcje. W związku z tym spada ryzyko, że wraz z pofermentem wylanym na pole wydostaną się bakterie *E.coli* lub *Salmonella*. HACCP w biogazowniach i kontrola wskaźników mikrobiologicznych mają jeszcze bardziej to ryzyko minimalizować.

Obowiązujące przepisy

Przed wylaniem na pola odpadu, jakim jest poferment, należy spełnić warunki z Rozporządzenia Ministra Środowiska

z dnia 20 stycznia 2015 r. w sprawie odzysku metodą R10 (Dz.U. z dn. 23 stycznia 2015 r., poz. 132). Dokument ten, w odniesieniu do pofermentu, odsyła nas do zapisów kolejnych ustaw i wynikających z nich rozporządzeń.

Aktem prawnym regulującym dopuszczalną zawartość mikroorganizmów w pofermencie jest Rozporządzenie Komisji Unii Europejskiej nr 142/2011 z dnia 25 lutego 2011 roku w sprawie wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 określającego (m.in.) przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi [...]. Sekcja 3. Załącznika V. określa standardy dotyczące pozostałości fermentacyjnych:

► liczba bakterii *Escherichia coli* lub z rodziny *Enterococcaceae* (enterokoki – rodzina paciorkowców kałowych) w pięciu pobranych próbkach tylko w jednej może przekraczać wartość 1000 w 1 g, ale nie może przekroczyć 5000 w 1 g.

Rozporządzenie nie określa konkretnej jednostki, ale liczebność bakterii podaje się najczęściej jako jednostki tworzące kolonie (jtk). Jednostka ta jest powszechnie stosowana w mikrobiologii i wynika z założenia, że liczy się pojedyncze kolonie, jakie wyrosły na

zżelowanej pożywce umieszczonej na płytce Petriego po wykonaniu posiewu (zdj. 1). Zakłada się wówczas, że jedna kolonia to widoczne gołym okiem zgrupowanie milionów bakterii o charakterystycznym kształcie i kolorze. Każda kolonia to klon pojedynczej komórki bakteryjnej, która znalazła się w danym miejscu na płytce;

► pozostałość nie może zawierać bakterii z rodzaju *Salmonella* w 25 g próbki, w pięciu powtórzeniach.

Rozporządzenie w pierwszym warunku pozostawia wybór między zbadaniem liczby bakterii *E.coli* a liczby bakterii z rodziny *Enterococcaceae*, a więc wybór między pojedynczym gatunkiem a całą rodziną mikroorganizmów. Nie wyklucza to oczywiście zbadania liczebności obu grup bakterii. W praktyce enterokoki są bardziej powszechne i bardziej odporne na wszelkie czynniki sanitaryczne, a więc w wielu próbkach pofermentu może ich być dużo więcej niż bakterii *E.coli*. Łatwiej jest więc spełnić wymagania rozporządzenia, badając liczebność *E.coli*, aczkolwiek może się

zdarzyć, że powiatowy lekarz weterynarii, który prowadzi nadzór nad daną biogazownią, będzie wymagał zbadania liczebności obu tych mikroorganizmów. Drugi warunek wynikający z Rozporządzenia 142/2011 jest o tyle rygorystyczny, że zakłada całkowity brak obecności w badanych próbkach bakterii z rodzaju *Salmonella*. Podobnie jak przy *E.coli* – badaniu powinno podlegać pięć niezależnych próbek, ale tu obowiązkowo każda powinna mieć masę 25 g (w sumie w 125 g). Wystarczy, że z jednej 25-gramowej próbki zostanie wyizolowana *Salmonella*, wynik całej analizy uznawany jest za pozytywny.

Kolejne wymagania względem czystości mikrobiologicznej pofermentu definiuje Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 czerwca 2008 r. (Dz.U. nr 119, poz. 76) w sprawie wykonania niektórych przepisów ustawy o nawozach i nawożeniu, które zostało wydane na mocy zapisów Ustawy z dnia 10 lipca 2007 r. roku o nawozach i nawożeniu. Z zapisów rozporządzenia w sprawie odzysku metodą R10 wynika,

że poferment jako odpad musi spełniać normy, jakie stosuje się dla nawozów organicznych. Wymagania te dotyczą również pofermentu, dla którego producent chce uzyskać status nawozu organicznego. Rozporządzenie „nawozowe” w art. 14, pkt. 2 i 3 mówi, że:

► liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* określana na podstawie liczby bakterii tlenowych nie może przekraczać 1000 jednostek tworzących kolonie na 1 gram nawozu (jtk/g);

► nawóz nie może zawierać w ogóle bakterii z rodzaju *Salmonella*;

► nawóz nie może zawierać żywych jaj pasożytów z gatunków *Ascaris*, *Trichuris*, *Toxocara* (ATT).

Pierwszy warunek stawiany przez rozporządzenie jest jasny, choć bardzo wymagający, szczególnie w przypadku biogazowni stosujących odpady pochodzenia zwierzęcego. Do rodziny *Enterobacteriaceae* należą mikroorganizmy, które można znaleźć praktycznie wszędzie: w wodzie, w glebie, na naszych rękach. Wydaje się więc, że dość łatwo może dojść do wtórnej kontaminacji próbek do badań.

REKLAMA



POLBIOTECH LABORATORIUM Sp. z o.o.
ul. Rubież 46B
61-612 POZNAŃ
www.polbiotech.pl
e-mail: laboratorium@polbiotech.pl
tel: +48 (61) 822 73 53

POLBIOTECH
laboratorium *10 lat na rynku!*

- Monitoring biotechnologiczny 
- Biogazodochodowość 
- Wartość nawozowa i mikrobiologia pofermentu 
- Badanie olejów i biogazu 
- Kalorymetria 
- Mikroelementy dla biogazowni 

PROFESJONALNA SUPLEMENTACJA DLA BIOGAZOWNI!



- Płynny, uniwersalny preparat ACINOR 1000 zawiera wszystkie mikroelementy niezbędne do utrzymania stabilnej i wydajnej fermentacji metanowej.
- Kluczowe pierwiastki występują w postaci łatwo przyswajalnych przez bakterie chelatów.
- Koncentrat stosowany w niskich dawkach – maksymalnie 0,8l/dobę na 1 MW mocy biogazowni.
- Przyspiesza rozruch i stabilizuje fermentację podczas bieżącej eksploatacji oraz „Jeczy” po nagłych zaburzeniach procesów biochemicznych i zakłamaniami produkcji biogazu.
- Dostawa w ciągu 1-3 dni roboczych.

Wymóg mówiący o braku obecności bakterii *Salmonella* jest tu przedstawiony mniej rygorystycznie, ponieważ nie określa wielkości próbki, w jakiej ma to być stwierdzone. Jednak i tak, by sprostac jednocześnie wymaganiom rozporządzenia 142/2011, badania należy wykonać zgodnie z jego wytycznymi (próbka 5 x po 25 g).

Trzeci warunek związany jest z analizą parazytologiczną ATT, a więc nie są to typowe oznaczenia mikrobiologiczne, ale biologiczne. Niemniej spełnienie wymagania jest również ważne i istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa stosowania pofermentu do celów nawozowych.

Odbiegając nieco od tematu – warto uzupełnić, że rozporządzenie „nawozowe” z dnia 18 czerwca 2008 r. (Dz.U. nr 119, poz. 76) określa również dopuszczalne zawartości metali ciężkich w pofermencie/nawozie: Cr – 100 mg; Cd – 5 mg; Ni – 60 mg; Pb – 140 mg; Hg – 2 mg; na 1 kg suchej masy. A rozporządzenie w sprawie odzysku metodą R10 (Dz.U. z dn. 23 stycznia 2015 r., poz. 132) nakłada na niektóre biogazownie dodatkowo konieczność badania gleb, na które poferment ma zostać rozlany.

Bakterie w pofermencie

Co właściwie eliminuje bakterie takie jak *Enterobacteriaceae* (w tym *Escherichia coli*) lub *Salmonella* ze środowiska, jakim jest fermentor? Przede wszystkim – konkurencja. Masa fermentująca obfituje w różne gatunki bakterii (tab. 1.), które koegzystują w tym środowisku w oparciu o symbiozę i komensalizm. Oznacza to, że np. odpady metaboliczne jednego gatunku bakterii stają się podstawowym składnikiem odżywczym innego. W fermentorze pojawia się cały łańcuszek takich powiązań między mikroorganizmami – a gdzieś na jego końcu są bakterie produkujące metan. Bakterie uczestniczące w fermentacji konkurują cały czas, na ogół skutecznie – z innymi bakteriami o miejsce w środowisku reaktora i o pokarm. Bakterie gorzej dostosowane do warunków panujących w danym momencie w masie fermentującej rozmnażają się wolniej i z czasem ich liczebność maleje, często do

wartości, przy których stają się niewykrywalne. Ponadto podczas fermentacji metanowej różne czynniki chemiczne (np. poziom pH, obecność kwasów organicznych, alkoholi, niektórych pierwiastków, soli i in.) i fizyczne (np. temperatura, ciśnienie, siły ścinające podczas mieszania) powodują redukcję liczby bakterii, również tych niechcianych, potencjalnie chorobotwórczych. Niebagatelną rolę w regulowaniu liczebności bakterii obecnych w pofermencie pełni również czas. Bakterie giną i rozmnażają się z określoną szybkością w różnych warunkach. Je-

Błędem popełnianym przez operatorów biogazowni jest dozowanie niektórych substratów (np. nadmiarowej gnojowicy) do zbiorników magazynowych lub zbiorników przeznaczonych na dofermentowanie, zwłaszcza gdy nie są one aktywnie ogrzewane i mieszane

żeli w fermentorze panują warunki niesprzyjające rozwojowi określonego gatunku bakterii – to im dłużej je w takich warunkach przetrzymamy, tym większe będzie prawdopodobieństwo, że jej liczebność nie wzrośnie lub ulegnie zredukowaniu. Przeciwnie – jeżeli bakteria napotka warunki sprzyjające swojej egzystencji – im dłużej będziemy ją inkubować, tym większe jest prawdopodobieństwo, że jej liczebność szybko wzrośnie.

Jak wspomniano wyżej, bakterie, również te niepożądane (*E.coli*, *Enterococaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*), oraz jaja pasożytów (*Ascaris*, *Trichuris* i *Toxocara*) dostają się do fermentorów wraz z dozowanymi substratami (odpadami). W biogazowniach, które mają stosunkowo nieduże fermentory (1000-2500 m³), które były wybudowane z myślą o stosowaniu w roli substratu kiszonki z kukurydzy, wykorzystanie odpadów o niższej niż kiszonka suchej masy znacznie skraca

hydrauliczny czas retencji. Oznacza to, że szybciej wymienia się cała objętość fermentora i skraca się czas przebywania w nim bakterii. Redukcja liczebności bakterii *E.coli* i innych może okazać się wówczas niewystarczająca, by poferment spełniał wymagania narzucone przez prawo. Aby ograniczyć takie ryzyko – można rozważyć prowadzenie fermentacji w warunkach termofilnych (52-55°C). Jest to temperatura, która nie sprzyja przetrwaniu bakterii chorobotwórczych i jaj pasożytów i skraca czas potrzebny na redukcję ich liczebności (lub całkowite unicestwienie). Dobrym rozwiązaniem jest ogrzewanie zawartości zbiorników magazynowych (nawet do 40-70°C). Dzięki temu bakterie dłużej przebywają w środowisku niesprzyjającym ich rozwojowi, a dodatkowo następuje pełniejsze odfermentowanie substratów.

Pobieranie próbek do badań mikrobiologicznych

To najważniejszy etap badań, nie tylko mikrobiologicznych. Łatwo tu popełnić błąd. Każda próbka musi być reprezentatywna i odzwierciedlać stan całej masy pofermentu, z jakiej była pobrana. Poferment powinien być dobrze wymieszany, a instalacja (rury, pompy, zawory itp.) powinny być bardzo dobrze przepłukane pofermentem przed pobraniem. Musi być pewne, że instalację wypełnia tylko poferment, a nie np. poferment z gnojowicą (bogate źródło bakterii), która chwilę wcześniej była pompowana przez te same rury. Końcówki króćców, z których pobiera się próbki, powinny być czyste, w miarę możliwości wyparzone gorącą wodą i odkażone alkoholem. Próbka powinna być pobrana do idealnie czystych naczyń, najlepiej specjalnych jałowych pojemników dostarczonych przez laboratorium. Po napełnieniu naczynia należy je szybko zamknąć równie czystym korkiem i schłodzić do 3-4°C. Tak przygotowaną próbkę należy dostarczyć do laboratorium w ciągu ok. 24 h od poboru. Podczas transportu powinny być utrzymane warunki chłodnicze (np. pudło styropianowe + zamrożone wcześniej wkłady chłodzące).

Należy pamiętać, że brudne końcówki węży, króćców metalowych lub

z tworzywa, niewystarczająco przepłukana pofermentem instalacja, a nawet brudne rękawice robocze stosowane podczas poboru mogą być źródłem bakterii, które będą oznaczone w próbce. Może to zafałszować wynik w kierunku niekorzystnym dla biogazowni.

Błędem popełnianym przez operatorów biogazowni jest dozowanie niektórych substratów (np. nadmiarowej gnojowicy) do zbiorników magazynowych lub zbiorników przeznaczonych na dofermentowanie, zwłaszcza gdy nie są one aktywnie ogrzewane i mieszane. W takim przypadku warunki panujące w zbiornikach są często zbyt łagodne, a czas przetrzymania zbyt krótki, by zapewnić właściwą redukcję liczebności bakterii chorobotwórczych lub jaj pasożytów.

Ryzykowne może być też dozowanie odpadów odzwierzęcych z pominięciem systemu do higienizacji lub sterylizacji lub niewłaściwe przeprowadzenie tego procesu. Niektóre biogazownie otrzymują od powiatowego lekarza weterynarii zgodę na tzw. alternatywne metody przetwarzania. Muszą wówczas udowodnić, że pomimo braku instalacji do higienizacji lub sterylizacji substrat odzwierzęcy w pełni przetworzony w biogazowni spełnia wymagania co do czystości mikrobiologicznej w zakresie wskazanym przez w/w rozporządzenia. Jest jednak ryzyko, że już po zatwierdzeniu takiego systemu przez PLW coś pójdzie nie tak, jak powinno i kolejne badania wykazą nieprawidłowości.

Salmonella w pofermentcie – co robić?

Stwierdzenie obecności bakterii *Salmonella* lub żywych jaj ATT w pulpie pofermentacyjnej oraz przekroczenie liczebności bakterii *E.coli*, *Enterobacteriaceae* lub *Enterococaceae* jest problemem, z którym nie tak łatwo sobie poradzić. W pierwszej kolejności należy sprawdzić, czy nie doszło do pomyłki lub niewłaściwego poboru próbki. Błędy przy poborze są często przyczyną zafałszowania wyniku. Jeżeli mamy pewność, że poferment nie spełnia norm, możemy podjąć następujące kroki: (1) podniesienie temperatury pofermentu w zbiorniku magazynowym (jeżeli jest ogrzewany), (2) ponowne przepuszczenie pofermentu przez fermentory pierwszego stopnia fermentacji (nie zawsze jest to możliwe ze względów logistycznych lub technologicznych), (3) znaczne podniesienie pH pofermentu, np. poprzez dodatek wapna.

W trakcie badań są preparaty biologiczne, które posłużą do sanizacji zakażonego pofermentu, ale ich powszechne stosowanie to jeszcze kwestia przyszłości.

Możliwości jest więc niewiele, wymagają czasu i środków. Warto więc od samego początku dbać o ten parametr i wykonywać badania kontrolne na tyle wcześniej, by była pewność, że poradzimy sobie z ewentualnym problemem przed terminem umożliwiającym rozlewanie pofermentu na pola i zanim przepełnią się zbiorniki magazynowe.

Warto też przewidzieć takie niespodzianki na etapie projektowania

biogazowni i przeanalizować możliwość prowadzenia procesu w warunkach termofilnych, zamontowania ogrzewania w zbiornikach na dofermentowanie i magazynowych oraz wyposażenia obiektu w sprawne instalacje do higienizacji lub sterylizacji dozowanych substratów.

dr inż. Artur Olesienkiewicz
mgr inż. Michał Grudziński
Politech Laboratorium Sp. z o.o.

Literatura:

Dziennik Ustaw z 23 stycznia 2015 r. pozycja 132, Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 20 stycznia 2015 r. w sprawie odzysku R10.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego).

Dziennik Ustaw 119, poz. 765, Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 czerwca 2008 r. w sprawie wykonania niektórych przepisów ustawy o nawozach i nawożeniu.

Rozporządzenie Komisji (UE) nr 142/2011 z dnia 25 lutego 2011 r. w sprawie wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 określającego przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, oraz w sprawie wykonania dyrektywy Rady 97/78/WE w odniesieniu do niektórych próbek i przedmiotów zwolnionych z kontroli weterynaryjnych na granicach w myśl tej dyrektywy.

Côté C., Massé D. I., Quessy S. (2006). Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries. *Bioresource Technology*, 97(4), 686-91.

Ghiglietti R., Genchi C., Di Matteo L., Calcaterra E., & Colombi A. (1997). Survival of *Ascaris suum* eggs in ammonia-treated wastewater sludges. *Bioresource Technology*, 59(2), 195-198.

Grudziński M., Pietruszka A., Sawicki W. (2015). Anaerobic digestion in sanitization of pig slurry and biomass in agricultural biogas plant. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(2), 524-526.

Nicholson F. A., Groves S. J., & Chambers B. J. (2005). Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresource Technology*, 96(2), 135-43.

Paluszak Z., Skowron K., Olszewska H., Skowron K. J., Bauza-Kaszewska J., & Gryń G. (2012). Sanitization efficacy of anaerobic digestion and aeration of slurry from the aspect of limiting emission of *Salmonella* into the environment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 19(3), 427-430.

Plym-Forsell L. (1995). Survival of salmonellas and *Ascaris suum* eggs in a thermophilic biogas plant. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 36(1), 79-85.

Sahlström L. (2003). A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. *Bioresource Technology*, 87(2), 161-166.

Tab. 1. Przykładowe bakterie należące do konsorcjum mikroorganizmów prowadzących fermentację metanową

Rodzaj:	Rola:
<i>Pseudomonas</i>	Tlenowe i beztlenowe bakterie biorące udział w procesie hydrolizy i kwasogenezы – rozkładają złożone związki organiczne w prostsze kwasy i cukry.
<i>Bacillus</i>	
<i>Streptococcus</i>	
<i>Clostridia</i>	
<i>Bifidobacteria</i>	
<i>Ruminococcus</i>	Głównie bezwzględnie beztlenowe bakterie mające znaczący udział w procesie octanogenezы – etapie wytwarzania kwasu octowego, który jest głównym pokarmem dla bakterii metanowych.
<i>Selenomonas</i>	
<i>Acetobacterium</i>	
<i>Methanobrevibacter</i>	Bewzględnie beztlenowe archeony potocznie nazywane bakteriami metanowymi odpowiadające za produkcję metanu.
<i>Methanobacterium</i>	
<i>Methanomicrobium</i>	