

#### IV. Streszczenie

Współoczyszczanie odcieków ze składowisk odpadów wraz ze ściekami komunalnymi w biologicznych oczyszczalniach ścieków stanowi w Polsce bardzo powszechną praktykę. Jednakże ze względu na złożony i zróżnicowany skład fizykochemiczny, wody odciekowe mogą być toksyczne dla mikroorganizmów osadu czynnego i niekorzystnie wpływać na proces usuwania zanieczyszczeń obecnych w ściekach. Bioaugmentacja osadu czynnego wydaje się być atrakcyjnym rozwiązaniem problemów wielu oczyszczalni ścieków, związanych z ich narażeniem na obecność wysokich stężeń wód odciekowych w ściekach. Strategia ta polega na wprowadzeniu do środowiska osadu wyselekcjonowanych szczepów lub konsorcjów mikroorganizmów w celu wzmocnienia potencjału degradacyjnego mikroorganizmów autochtonicznych oraz poprawy stanu jego funkcjonowania. Introdukowane do osadu czynnego szczepy, obok wysokiego potencjału degradacyjnego, powinny cechować się zdolnością do produkcji związków wspomagających rozkład zanieczyszczeń obecnych w ściekach, tj. sideroforów, bioflokulantów i biosurfaktantów. Powinny być także zdolne do wbudowania się w strukturę kłaczków i koagregacji z mikroorganizmami autochtonicznymi egzystującymi w tym ekosystemie.

Głównym celem rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami z osadów dennych stawu Kalina w Świętochłowicach z wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów bakterii oraz ich konsorcjum na efektywność usuwania zanieczyszczeń w ściekach. Dodatkowo oceniano wpływ bakterii inokulowanych do osadu na jego kondycję oraz aktywność enzymatyczną, żywą biomasę i potencjał funkcjonalny zespołów mikroorganizmów autochtonicznych zasiedlających to środowisko.

Charakterystyka składu fizykochemicznego i mikrobiologicznego odcieków pochodzących z osadów dennych stawu Kalina wykazała, że były one wysoko obciążone ładunkiem zanieczyszczeń organicznych i obecne w nich były wskaźnikowe bakterie chorobotwórcze, co łącznie może stanowić potencjalne zagrożenie sanitarne i epidemiologiczne dla środowiska. Egzystujące w wodach odciekowych mikroorganizmy heterotroficzne charakteryzowały się niskim potencjałem funkcjonalnym i słabą aktywnością metaboliczną. Badania toksyczności ostrej odcieków pozwoliły na wyznaczenie wartości NIC, EC<sub>50</sub> i MIC<sub>100</sub>, odpowiednio 3,45%, 6,69% i 11,26%.

Analiza wpływu długotrwałej obecności 3,5%, a następnie 5,5% odcieków w ściekach na parametry operacyjne procesu oczyszczania ścieków syntetycznych wykazała spadek efektywności usuwania ChZT w bioreaktorze typu SBR, któremu towarzyszył wzrost wartości pH w ściekach do 9,3. Ponadto zaobserwowano, że zmiany pH w bioreaktorze obciążonym odciekami były skorelowane z pogorszeniem się właściwości sedymentacyjnych osadu czynnego, o czym świadczyła niska wartość indeksu opadowego (IO), poniżej 70 cm<sup>3</sup>/g. Analizy mikroskopowe potwierdziły także zmiany morfologiczne kłaczków w osadzie czynnym obciążonym odciekami. Wyniki badań wskazały, że obecność odcieków w osadzie czynnym przyczyniła się do obniżenia stosunku MLVSS do MLSS, który był zbyt niski, aby możliwe było osiągnięcie efektywnego usunięcia zanieczyszczeń w ściekach. Ponadto zawartość zawiesin ogólnych w tym bioreaktorze poniżej 2,5 mg/l nie pozwalała na osiągnięcie pożądanego stężenia mikroorganizmów w osadzie czynnym. Wyniki badań dotyczących zmian różnorodności funkcjonalnej zespołów mikroorganizmów zasiedlających osad czynny obciążony odciekami w stężeniach 3,5% i 5,5% wskazały na utratę zdolności mikroorganizmów autochtonicznych osadu czynnego do metabolizowania odpowiednio 33% i 40% substratów na płytkach EcoPlate™. Mikroorganizmy autochtoniczne w tych osadach preferencyjnie metabolizowały przede wszystkim węglowodany i związki fenolowe. Porównując mikroorganizmy z bioreaktora kontrolnego oraz obciążonego wodami odciekowymi stwierdzono, że bakterie narażone na działanie odcieków odznaczały się większą zdolnością do utylizacji związków zawierających azot, lecz nie potrafiły metabolizować związków zawierających fosfor. Otrzymane wyniki wskazują, że wprowadzenie wód odciekowych do ścieków znacząco wpłynęło także na obniżenie aktywności dehydrogenaz i

niespecyficznym esteraz w osadzie czynnym, co było skorelowane z obniżeniem aktywności metabolicznej w tym ekosystemie. Niska aktywność metaboliczna w osadzie czynnym obciążonym odciekami korespondowała z utratą zdolności mikroorganizmów autochtonicznych do utylizowania określonych substratów wzrostowych, m.in. związków zawierających fosfor oraz ze wzrostem wykorzystania związków fenolowych i zawierających azot. Analiza uzyskanych profili kwasów tłuszczowych (FAMES) wykazała, że mikroorganizmy autochtoniczne osadu czynnego były bardzo wrażliwe na zanieczyszczenia obecne w wodach odciekowych i uruchamiały mechanizmy adaptacji do obecności odcieków w ściekach syntetycznych. Zasadnicze zmiany w profilach FAMES polegały na wzroście zawartości kwasów nasyconych, w tym głównie kwasów rozgałęzionych i cyklopropanowych. W odpowiedzi na stres pH, wynikający z obecności odcieków w ściekach, w profilach FAMES zaobserwowano także wzrost zawartości kwasów rozgałęzionych o izomerii *anteiso* w stosunku do kwasów o izomerii *iso*. Różnice w udziale procentowym poszczególnych kwasów tłuszczowych w profilach FAMES analizowanych próbek osadu czynnego były związane z różnicami w strukturze zespołów mikroorganizmów w tym środowisku. W dniu zakończenia eksperymentu w profilach FAMES zarówno kontrolnego, jak i obciążonego odciekami osadu czynnego dominowały kwasy charakterystyczne dla bakterii Gram-ujemnych. W przeciwieństwie do osadu kontrolnego, w profilach FAMES uzyskanych dla osadu obciążonego odciekami zaobserwowano dodatkowo spadek udziału procentowego markerowych kwasów tłuszczowych dla Protozoa i wzrost zawartości procentowej markerów FAMES dla bakterii Gram-dodatnich i grzybów.

Po dokonaniu szczegółowej charakterystyki 10 szczepów bakterii, spośród nich do badań bioaugmentacyjnych wybrano dwa szczepy *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3. Wyselekcjonowane mikroorganizmy były zdolne do wzrostu w obecności wysokich stężeń katecholu, benzoenu, kwasu 4-hydroksybenzoowego, kwasu 3,4-dihydroksybenzoowego, fenolu, 2-metylofenolu, 4-metylofenolu oraz mieszaniny krezoli. Ponadto posiadały zdolność do produkcji sideroforów, wspomagających działanie enzymów zaangażowanych w rozkład związków aromatycznych. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły również, że oba szczepy koagregowały z mikroorganizmami autochtonicznymi osadu czynnego i charakteryzowały się silną zdolnością do bioflokulacji (50% do 70%). Poza tym posiadały zdolność do syntezy substancji egzopolisacharydowych i N-AHLs. Na podstawie adhezji komórek do *p*-ksylenu zostały zaklasyfikowane do bakterii o silnych właściwościach hydrofobowych (CSH > 50%). Warto jednak podkreślić, że jedynie u szczepu *P. putida* OR45a obecność odcieków prowadziła do modyfikacji powierzchni komórek w kierunku bardziej hydrofobowego charakteru niż u *P. putida* KB3, co może sugerować, że bakteria ta była zdolna do degradacji zanieczyszczeń obecnych w wodach odciekowych. Wstępna ocena zdolności szczepów do produkcji biosurfaktantów wskazała na ich potencjalną zdolność do produkcji związków powierzchniowo czynnych. Z kolei analiza obu szczepów pod kątem ich zdolności do emulgowania węglowodorów obecnych w oleju diesla potwierdziła, że produkowały one związki odznaczające się wysoką aktywnością emulgującą (> 45%).

Analiza genomów *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 potwierdziła ich zdolność do rozkładu jednopierścieniowych związków aromatycznych i produkcji egzopolisacharydu – alginianu. Ponadto u badanych mikroorganizmów stwierdzono obecność genów kodujących białka pośredniczące w obronie przed stresem oksydacyjnym. Zarówno szczep *P. putida* OR45a, jak i *P. putida* KB3 posiadały pompy efflux, zwiększające ich oporność na różne rozpuszczalniki, takie jak: *n*-heksan, *p*-ksylen, toluen, styren, *m*-ksylen, propylobenzen i etylobenzen. W genomach badanych bakterii wykazano dodatkowo obecność operonu *mer*, związanego z opornością komórek na jony Hg<sup>2+</sup>, a w genomie szczepu *P. putida* KB3 potwierdzono obecność genów kodujących białka odpowiedzialne za przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu wywołanemu przez jony chromu. Oba szczepy posiadały także zdolność do wzrostu w obecności wysokich stężeń jonów amonowych, wynoszących odpowiednio 600 i 1000 µg/ml.

Ostatnim etapem prac było zbadanie efektywności procesu oczyszczania ścieków w wyniku bioaugmentacji osadu czynnego obciążonego odciekami z użyciem wyselekcjonowanych szczepów *P.*

*putida* OR45a i *P. putida* KB3 oraz ich konsorcjum. Po zakończeniu eksperymentu istotne statystyczne ( $p < 0,05$ ) ubytki badanych związków fenolowych stwierdzono we wszystkich bioaugmentowanych reaktorach. Największy ubytek tych związków (95%) odnotowano w osadzie czynnym bioaugmentowanym szczepem *P. putida* KB3, podczas gdy w osadzie niepoddanym bioaugmentacji mikroorganizmy autochtoniczne były zdolne do rozkładu jedynie 50% związków fenolowych obecnych w odcieku. Wysoka efektywność usuwania fenoli w układach inokulowanych szczepami *P. putida* OR45a i *P. putida* KB3 oraz ich konsorcjum korespondowała z wysoką skutecznością usuwania zanieczyszczeń organicznych oraz azotu amonowego. Bioaugmentacja z użyciem wyselekcjonowanych szczepów umożliwiła także utrzymanie stabilności procesu oczyszczania ścieków, co może świadczyć o tym, że między wprowadzonymi do bioreaktora szczepami bakteryjnymi, jak również między tymi bakteriami a mikroorganizmami autochtonicznymi nie doszło do oddziaływań antagonistycznych. W tym etapie badań przeprowadzono również ocenę wpływu bioaugmentacji na kondycję, aktywność enzymatyczną i metaboliczną oraz potencjał funkcjonalny osadu czynnego obciążonego odciekami. Stwierdzono, że obecność odcieku w ściekach przyczyniła się do obniżenia wartości SOUR w osadzie czynnym o 53%. Dla porównania parametr ten osiągał prawie 2-3-krotnie wyższe wartości w bioreaktorach obciążonych odciekami i bioaugmentowanych wybranymi szczepami bakterii, a także w bioreaktorze kontrolnym, oczyszczającym jedynie ścieki syntetyczne. Stwierdzono również, że obecność odcieków w ściekach w największym stopniu wpłynęła na aktywność dehydrogenaz, esteraz i katalaz w bioreaktorze niepoddanym bioaugmentacji, przyczyniając się do znacznego zmniejszenia ich aktywności, która w bioreaktorze kontrolnym oraz w bioreaktorach bioaugmentowanych była 3-4-krotnie wyższa. Wzrost aktywności drobnoustrojów w bioaugmentowanym osadzie czynnym obciążonym odciekami był skorelowany ze wzrostem biomasy osadu, a także liczebności mikroorganizmów heterotroficznych, podczas gdy w reaktorze niebioaugmentowanym nastąpiło znaczne obniżenie tych parametrów. Stwierdzono, że mikroorganizmy w reaktorach obciążonych odciekami były mniej metabolicznie aktywne niż bakterie w bioreaktorze kontrolnym oraz w reaktorach bioaugmentowanych. Obecność odcieku w ściekach stanowiła silny czynnik stresowy dla mikroorganizmów w osadzie czynnym. Bioreaktor obciążony odciekami nie działał prawidłowo, o czym świadczył wysoki wskaźnik SBI ( $< 50\%$ ). Wprowadzenie wyselekcjonowanych szczepów bakteryjnych do osadu czynnego łagodziło toksyczne działanie obecnych w odciekach substancji, a tym samym przyczyniło się do obniżenia poziomu stresu w tym środowisku (SBI  $< 40\%$ ) i pozwalało na utrzymanie wysokiej aktywności metabolicznej. Analiza profili metabolicznych bakterii w osadzie czynnym współoczyszczającym ścieki syntetyczne i odcieki wskazała na mniejszą specjalizację mikroorganizmów w reaktorach inokulowanych wyselekcjonowanymi szczepami. Znaczny wzrost zdolności zespołów mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie czynnym bioaugmentowanym z użyciem wyizolowanych szczepów do metabolizowania związków fenolowych może wskazywać na zdolność inokulowanych bakterii do przetrwania i proliferacji w tym środowisku.

Analiza parametrów operacyjnych, wskaźników kondycji osadu czynnego i potencjału funkcjonalnego mikroorganizmów autochtonicznych w osadzie czynnym obciążonym odciekami ze stawu Kalina wskazała na silną korelację między strategią bioaugmentacji a wysoką aktywnością mikrobiologiczną i efektywnością procesu oczyszczania ścieków. Najbardziej efektywną spośród zastosowanych strategii bioaugmentacji okazała się inokulacja osadu czynnego szczepem *P. putida* KB3. Ze względu na wysoki potencjał bioaugmentacyjny, wprowadzenie szczepu *P. putida* KB3 do osadu może stanowić efektywne rozwiązanie problemów wielu oczyszczalni ścieków obciążonych zafenolowanymi odciekami ze składowisk odpadów.